

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DIEGO ARAUJO DE LIMA D'AGOSTIN

**AUTOMAÇÃO DE FOTOBIORREATORES PARA CULTIVO DE MICROALGAS EM
REGIME CONTÍNUO VISANDO AUMENTO DA PRODUTIVIDADE**



CURITIBA

2017

DIEGO ARAUJO DE LIMA D'AGOSTIN

**AUTOMAÇÃO DE FOTOBIORREATORES PARA CULTIVO DE MICROALGAS EM
REGIME CONTÍNUO VISANDO AUMENTO DA PRODUTIVIDADE**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia e Ciências dos Materiais no Curso de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências dos Materiais, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. André Bellin Mariano

Co-orientador: Prof. Ph.D. Marlio José do Couto Bonfim

CURITIBA

2017

D127a

D'Agostin, Diego Araujo de Lima

Automação de fotobiorreatores para cultivo de microalgas em regime contínuo visando aumento da produtividade / Diego Araujo de Lima D'Agostin. – Curitiba, 2017.

83 f. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências dos Materiais, 2017.

Orientador: André Bellin Mariano – Co-orientador: Marlio José do Couto Bonfim.

Bibliografia: p. 75-81.

1. Microalgas – cultivo. 2. Biorreatores. 3. Biomassa. 4. Biocombustíveis. I. Universidade Federal do Paraná. II. Mariano, André Bellin. III. Bonfim Marlio José do Couto. IV. Título.

CDD: 662.88



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS EXATAS
Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS

ATA Nº332

**ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS**

No dia sete de Julho de dois mil e dezessete às 10:00 horas, na sala de Conferências, NPDEAS, Campus Politécnico da UFPR, foram instalados os trabalhos de arguição do mestrando **DIEGO ARAUJO DE LIMA D'AGOSTIN** para a Defesa Pública de sua Dissertação intitulada **Automação de Fotobiorreatores para Cultivos em Regime Contínuo Visando Aumento da Produtividade**. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: ANDRE BELLIN MARIANO (UFPR), EMERSON DILAY (UP), JOSE VIRIATO COELHO VARGAS (UFPR). Dando início à sessão, a presidência passou a palavra ao discente, para que o mesmo expusesse seu trabalho aos presentes. Em seguida, a presidência passou a palavra a cada um dos Examinadores, para suas respectivas arguições. O aluno respondeu a cada um dos arguidores. A presidência retomou a palavra para suas considerações finais. A Banca Examinadora, então, reuniu-se e, após a discussão de suas avaliações, decidiu-se pela aprovação do aluno. O mestrando foi convidado a ingressar novamente na sala, bem como os demais assistentes, após o que a presidência fez a leitura do Parecer da Banca Examinadora. A aprovação no rito de defesa deverá ser homologada pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais do programa. A outorga do título de mestre está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, ANDRE BELLIN MARIANO, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 07 de Julho de 2017.



ANDRE BELLIN MARIANO

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



EMERSON DILAY

Avaliador Externo (UP)



JOSE VIRIATO COELHO VARGAS

Avaliador Interno (UFPR)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS EXATAS
Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **DIEGO ARAUJO DE LIMA D'AGOSTIN** intitulada: **Automação de Fotobiorreatores para Cultivos em Regime Contínuo Visando Aumento da Produtividade**., após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 07 de Julho de 2017.

ANDRE BELLIN MARIANO

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

EMERSON DILAY

Avaliador Externo (UP)

JOSE VIRIATO COELHO VARGAS

Avaliador Interno (UFPR)

AGRADECIMENTOS

Ao Altíssimo, Criador de todas as coisas visíveis e invisíveis, que em sua Sabedoria e Inteligência nos agracia com a Vida e nos permite entender-La em cada questionamento esclarecido sobre a Natureza.

À minha família, em especial minha bisavó Carolina, por todo carinho e apoio que me deram em minha caminhada.

Ao Prof. André por sempre estar de portas abertas, por acreditar e fornecer todo apoio necessário para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Marlio pela parceria e seus conhecimentos compartilhados para o aprimoramento deste projeto.

Aos alunos de iniciação científica Guilherme Domene, Andressa Oliveira e Isadora Ikeda pela ajuda na construção do protótipo e no cuidado dos cultivos.

Ao pessoal do NPDEAS que me ajudaram na condução dos experimentos, e principalmente pelo companheirismo.

Ao PIPE pela oportunidade.

Ao CAPES pelo auxílio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram com meu crescimento pessoal.

“Pois Vontade pura,
desembaraçada de propósito,
livre de ânsia de resultado,
é toda via Perfeita.”
(AL I: 44)

RESUMO

O objetivo deste trabalho consistiu em automatizar um fotobiorreator para cultivo de microalgas em regime contínuo em escala laboratorial e realizar o monitoramento remoto. Para tanto foi desenvolvido um sensor de concentração celular, utilizando o princípio de espalhamento de luz (*light scattering*), ou seja, através da medida da turbidez do meio de cultivo pelo uso de um conjunto de foto-transistor e um LED verde. Este sensor apresentou um erro percentual absoluto médio de 8,46% durante o experimento. Também foi montado no fotobiorreator uma sonda de pH, temperatura e um sensor de iluminância. A aquisição dos sinais dos sensores foi realizado por meio de um microcontrolador Arduino Mega 2560. Para o controle e monitoramento remoto do experimento, um banco de dados, para o registro das variáveis, foi elaborado e implementado em um Raspberry Pi conectado à rede. Através de um script em Python, os gráficos e dados coletados ficam disponíveis em uma página HTML que permite alterações nas formas de operação do fotobiorreator, por exemplo, através da alteração das taxas de diluição. O controlador foi capaz operar o fotobiorreator em regime contínuo com o registro automático das variáveis medidas. Operar fotobiorreatores em modo contínuo aumentou em 74,5% a produtividade de biomassa em comparação ao sistema em batelada e 28,2% em relação ao processo semicontínuo.

Palavras-chave: microalgas, cultivo contínuo, sensor de densidade ótica, automação.

ABSTRACT

The objective of this work was to design and develop sensors and controllers to automate microalgae cultivation on a continuous basis in laboratory scale and allow remote monitoring and control. For this, a sensor were developed capable of measuring cell concentration . The cell concentration sensor used the principle of light scattering, that is, by measuring the turbidity of the culture medium by the use of a set of phototransistor and green led. It presented an mean absolute percentage error of 8,46% during the experiment. A pH, temperature and light sensor were also installed. The control of all the sensors was accomplished by means of an Arduino Atmega2560 microcontroller. For remote control and monitoring of the controller, a database was designed and implemented on a Raspberry Pi connected to the network. Through a Python script, the graphics and data collected are available on an HTML page that allows changes in the ways the photobioreactor works, for example by changing the dilution rates. The controller was able to operate the photobioreactor in batch mode, as well as to maintain the culture operating in continuous regime. The continuous production of microalgae biomass in a continuous regime showed productivity 74,5% higher than the traditional batch process and 28,2% higher than semicontinuous cultivation.

Key-words: microalgae, continuous cultivation, optic density sensor, automation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – EXEMPLOS DE ESPÉCIES DE MICROALGAS:	18
FIGURA 2 – SISTEMAS ABERTOS DE CULTIVO DE MICROALGAS	20
FIGURA 3 – SISTEMAS FECHADOS DE CULTIVO DE MICROALGAS	21
FIGURA 4 – CURVA DE CRESCIMENTO DE MICROALGAS:	22
FIGURA 5 – CULTIVO DE MICROALGAS EM REGIME SEMI-CONTÍNUO.	23
FIGURA 6 – SISTEMA PARA CULTIVO DE MICROALGAS EM REGIME CONTÍNUO	24
FIGURA 7 – SISTEMA DE CULTIVO CONTÍNUO TIPO TURBIDOSTATO	26
FIGURA 8 – ETAPAS DE TRANSFORMAÇÃO DE BIOMASSA DE MICROALGAS EM BIOCOMBUSTÍVEIS.....	31
FIGURA 9– REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO	31
FIGURA 10– FLUXOGRAMA DAS ATIVIDADES REALIZADAS NO NPDEAS.	33
FIGURA 11– ATENUAÇÃO DA INTENSIDADE LUMINOSA ATRAVÉS DE UMA AMOSTRA.....	39
FIGURA 12 – CONTROLE TIPO REALIMENTADO	41
FIGURA 13– CONTROLE TIPO ANTECIPATÓRIO	41
FIGURA 14– OBJETIVOS E ESTRATÉGIAS.....	45
FIGURA 15– FOTOBIORREATOR USADO NOS EXPERIMENTOS	47
FIGURA 16 – BOMBA PERISTÁLTICA.....	50
FIGURA 17 – ESPECTRO DE EMISSÃO DO LED.....	51
FIGURA 18 – SENSOR DE DENSIDADE ÓTICA	52
FIGURA 19 – ELETRODO PARA MEDIÇÃO DE PH.....	53
FIGURA 20 – CIRCUITO PARA MEDIÇÃO DE PH	54
FIGURA 21– SONDA DE TEMPERATURA	54
FIGURA 22 – MINICOMPUTADOR SERVIDOR DE DADOS (RASPBERRY PI).....	56
FIGURA 23 – PROCEDIMENTO DE CALIBRAÇÃO.....	58
FIGURA 24 – CURVA DE CALIBRAÇÃO	59
FIGURA 25– DIAGRAMA DE INSTRUMENTAÇÃO.	60
FIGURA 26– SISTEMA AUTOMATIZADO PARA FOTOBIORREATORES	60
FIGURA 27– DIAGRAMA DE FLUXO DE INFORMAÇÕES	61
FIGURA 28– PÁGINA DE SUPERVISÃO E CONTROLE	61

FIGURA 29– PÁGINA DE INSERÇÃO DE DADOS DAS ANÁLISES LABORATORIAIS	62
FIGURA 29– VISUALIZAÇÃO DO GRÁFICO DE PH	63
FIGURA 30 – VISUALIZAÇÃO DO GRÁFICO DE TEMPERATURA.....	63
FIGURA 31– VISUALIZAÇÃO DO GRÁFICO DA ILUMINÂNCIA ATRAVÉZ DO FBR.	64
FIGURA 32– CULTIVO REGIME BATELADA E AJUSTE DO MODELO DE CRESCIMENTO	65
FIGURA 33 – CULTIVO EM REGIME SEMICONTÍNUO:	66
FIGURA 34 – CULTIVO EM REGIME CONTÍNUO E ESTIMAÇÃO DO SENSOR ...	68
FIGURA 35 – PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA E LIPÍDEOS DOS REGIMES DE CULTIVO AVALIADOS	71

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – SENSORES E EQUIPAMENTOS USADOS PARA MEDIÇÕES EM BIORREATORES.....	36
TABELA 2– ESTRATÉGIAS DE CONTROLE PARA FOTOBIORREATORES	42
TABELA 3– COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO MEIO DE CULTIVO SINTÉTICO CHU. .	46
TABELA 4– CÁLCULO DAS PRODUTIVIDADES PARA O REGIME BATELADA....	65
TABELA 5– CÁLCULO DA PRODUTIVIDADE MÉDIA PARA O REGIME SEMICONTÍNUO	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FBR	- Fotobiorreator
NPDEAS	- Núcleo de desenvolvimento em energia autossustentável
RPi	- Raspberry PI
HTML	- <i>Hyper text mark-up language</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

X	Concentração de biomassa (g. L ⁻¹)
μ	Taxa específica de crescimento (dia ⁻¹)
S	Concentração de substrato (g. L ⁻¹)
S _f	Concentração de substrato na alimentação (g. L ⁻¹)
Y _{x/s}	Taxa de conversão de substrato em biomassa
D	Taxa de diluição (dia ⁻¹)
F	Vazão de alimentação/retirada (ml.dia ⁻¹)
V	Volume do fotobiorreator
I ₀	Intensidade luminosa incidente
I	Intensidade luminosa transmitida
T	Transmitância
A	Absorbância
ε	Coeficiente de extinção molar
λ	Comprimento de onda
ℓ	Comprimento do caminho óptico
®	- marca registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	ENERGIA	15
2.1.1	Biomassa e Biocombustíveis	16
2.2	MICROALGAS.....	18
2.2.1	Sistemas de cultivo de microalgas.....	19
2.2.2	Modos de operação de fotobiorreatores	22
2.2.3	Aplicações biotecnológicas de cultivos em regime contínuo.....	27
2.2.4	Biocombustíveis a partir da biomassa de microalgas.....	29
2.2.5	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável	32
2.3	AUTOMAÇÃO E CONTROLE DE FOTOBIORREACTORES.....	33
2.3.1	Monitoramento.....	35
2.3.2	Sensores para determinação de biomassa	38
2.3.3	Controle	40
3	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	43
3.1	OBJETIVO GERAL	44
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4	MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1	MICROALGA E MEIO DE CULTIVO	46
4.2	FOTOBIORREATOR E CONDIÇÕES DE CULTIVO	46
4.3	AVALIAÇÃO DO CULTIVO	47
4.3.1	Determinação da densidade celular.....	47
4.3.2	Determinação da biomassa seca.....	47
4.3.3	Determinação da absorbância	48
4.3.4	Determinação manual de pH.....	48
4.3.5	Determinação de teor de lipídeos totais.....	49
4.3.6	Produtividade de biomassa.....	49
4.4	SISTEMA DE DILUIÇÃO AUTOMÁTICA E AQUISIÇÃO DE DADOS	50
4.4.1	Bombas peristálticas	50
4.4.2	Sensor de concentração de biomassa.....	51
4.4.3	Microcontrolador Arduino Mega 2560™	52

4.4.4	Determinação de pH <i>in situ</i> através da aquisição de dados.....	53
4.4.5	Determinação da temperatura por aquisição de dados.....	54
4.4.6	Medição de iluminância.....	55
4.4.7	Sistema de supervisão <i>web</i>	55
4.5	ANALISE DE INCERTEZAS	56
4.5.1	Erro de estimação do sensor	56
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
5.1	CALIBRAÇÃO DO SENSOR DE CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA	58
5.2	SISTEMA AUTOMATIZADO DE CULTIVO	59
5.3	AVALIAÇÃO DA PRODUTIVIDADE DOS REGIMES DE CULTIVO.....	64
5.3.1	Cultivos em regime batelada e semicontínuo	64
5.3.2	Cultivo em regime contínuo.....	67
5.3.3	Teor de lipídeos nas microalgas dos regimes avaliados	70
6	CONCLUSÕES	72
7	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	74
	REFERÊNCIAS.....	75
	ANEXO A – CIRCUITO PARA MEDIÇÃO DE PH	83

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO E MOTIVAÇÃO

O desenvolvimento da sociedade humana está se direcionando a uma revisão de suas diretrizes, principalmente no que diz respeito ao consumo energético e seu impacto no meio ambiente. As previsões de crescimento populacional implicam conseqüentemente, o aumento da demanda por energia, atualmente baseada em combustíveis fósseis, detentora de uma grande porcentagem da matriz energética mundial. Sua utilização gera grandes emissões de gás carbônico (CO₂) e outros poluentes. Estes gases quando encontrados em níveis muito superiores ao natural, devido à atividade humana, contribui com aumento do efeito estufa, agravando os futuros cenários do aquecimento global. Aliado a questão ambiental, está o problema de que os combustíveis fósseis têm suas reservas limitadas e sua reabilitação na natureza possui um tempo muito elevado, ou seja, é uma fonte não renovável. Assim, os investimentos em pesquisas e desenvolvimento tem sido uma estratégia fundamental para fazer com que as fontes renováveis ganhem maior participação na matriz energética. Como exemplo, temos os biocombustíveis.

Como matéria-prima para a produção de biocombustíveis são usadas várias espécies vegetais, e entre a rica biodiversidade encontrada em nosso país, algumas espécies de microalgas tem ganhado destaque por atender os requisitos necessários. Diferentes dos cultivos terrestres, elas precisam de estruturas, chamadas fotobiorreatores, capazes de garantir uma boa produtividade e qualidade de biomassa. As microalgas apresentam vantagens em relação às plantas cultivadas como rápido crescimento, alto teor de óleos e possibilidade de utilização de água imprópria para a agricultura. Em grande parte dos casos de produção de microalgas em larga escala, o acompanhamento do cultivo é feito de forma *offline*, isto é, são retiradas amostras que são analisadas posteriormente por técnicos treinados, o que por sua vez demanda tempo e implica um grau baixo de monitoramento em tempo real e de registro das variáveis de processo de forma automatizada (FILHO, 2014). Pode-se afirmar que a falta de equipe treinada para monitorar os cultivos de microalgas e, ainda, especialistas disponíveis no mercado que dominem esse

assunto são fatores que dificultam a produção de microalgas em larga escala e colaboram para o insucesso de muitos empreendimentos.

Este trabalho visa à automação de cultivos de microalgas para operá-lo em modo contínuo. Este tipo de operação possui algumas características que possibilita obter biomassa uniforme e de forma constante por longo período sem a necessidade de possíveis pausas no processo ou começar um novo cultivo e também a manutenção da densidade populacional ótima, ou seja, manter o crescimento na sua fase exponencial, sendo uma estratégia em potencial para o aumento da produtividade de biomassa. Para a automação são necessários sistemas de controle e monitoramento que, além de propiciar a produção contínua de microalgas vão permitir a coleta de dados em tempo real dos experimentos sem a necessidade de um analista especializado em microbiologia.

1.2 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

O Capítulo 1 introduz o contexto geral sob o qual o trabalho foi desenvolvido, abordando os principais conceitos e motivações.

O Capítulo 2 traz uma revisão bibliográfica fazendo um levantamento do conteúdo já publicado na literatura científica mundial, mostrando o estado da arte em relação ao cultivo de microalgas, principais técnicas de cultivo e as tecnologias de controle e automação utilizadas para o melhoramento do processo.

O Capítulo 3 é apontado a motivação e justificativa do trabalho e define-se o objetivo geral e os objetivos específicos para atingi-lo.

O Capítulo 4 apresenta a metodologia usada para a implementação de automação em fotobiorreatores e para a operação em regime contínuo.

O Capítulo 5 apresenta os resultados e discussão. O Capítulo 6 apresenta as conclusões do estudo realizado e o Capítulo 7 indica propostas para trabalhos futuros.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ENERGIA

Energia move o mundo, no sentido mais literal da frase. Em tudo o que fazemos, há energia envolvida. No decorrer da história da civilização humana, a busca por soluções energéticas sempre determinou as condições do desenvolvimento. Desde a descoberta e o domínio da forma mais elementar de energia, o fogo – fundamental para a sobrevivência, nas primeiras fogueiras, provendo aquecimento e proteção; e também nos avanços tecnológicos, na confecção de objetos de metal – até a busca atual por novas fontes de energia que agreguem desenvolvimento e sustentabilidade, a vanguarda do domínio tecnológico da energia sempre caminhou lado a lado com o domínio econômico (BASSAN E ROCHA, 2014). O grande marco que demonstra esta estreita relação entre estes dois fatores - energia e economia - aconteceu no século XVIII, com Revolução Industrial. Essa revolução da forma de produção trouxe a primeira grande mudança de paradigma energético: pela primeira vez na história, buscou-se utilizar energia motriz, advinda de máquinas a vapor, para substituir as forças animal e humana. Diante desse cenário que prossegue até a atualidade, a utilização de diversas fontes de energia como o carvão mineral, o petróleo, a eletricidade entre tantas outras, passou a se disseminar intensamente (GOMES, 2010).

Pode-se classificar a energia segundo sua disponibilidade no planeta: fontes renováveis e não renováveis. As fontes não renováveis consistem, de forma geral, os combustíveis fósseis e energia nuclear. Combustíveis fósseis se originaram pelo acúmulo de matéria orgânica na crosta terrestre, e através de processos naturais bioquímicos e geológicos, que levam milhões de anos, deram origem ao petróleo, ao gás natural e ao carvão mineral. Já a energia nuclear é relacionada ao fenômeno atômico da fissão, onde um átomo de peso atômico elevado é bombardeado por partículas menores, ocasionando assim sua desintegração, onde há liberação de energia. A denominação não renovável é devido ao grande intervalo de tempo para se formar, não sendo possível obtê-lo de forma rápida e também por ter uma quantidade limitada. Enquanto as fontes renováveis são aquelas onde o ciclo de obtenção é significativamente menor que as não renováveis, como biomassa e biocombustíveis (oriundos de cultivos vegetais e gorduras animais); e são

abundantes, por exemplo, a energia solar, eólica e hídrica. Sua principal vantagem em relação aos combustíveis fósseis é a baixa ou nula emissão de poluentes.

2.1.1 Biomassa e Biocombustíveis

Com a Revolução Industrial, e todas suas etapas posteriores, surgiram inúmeros avanços tecnológicos, principalmente voltados para substituir o trabalho, executado ora por tração animal, ora por fontes naturais, citadas anteriormente, por máquinas. Assim, com a invenção da máquina a vapor e dos motores de combustão interna, tanto automotivos quanto estacionários (geradores de eletricidade), a procura de uma forma eficiente de energia fez com que o carvão mineral e os combustíveis derivados do petróleo viessem a se tornar a fonte mais utilizada, deixando as fontes naturais (solar, eólica, hídrica) e a biomassa como fontes complementares. Entretanto, nas últimas décadas, elas tem retomado certa importância, relacionada diretamente com a sua sustentabilidade.

Biomassa é definida como um material orgânico que acumula energia solar em forma de energia química em forma de carboidratos através da fotossíntese. O uso de biomassa como combustível é um processo de carbono “neutro”, desde que o CO₂ emitido pela queima é fixado pelo cultivo da fonte da biomassa (BHASKAR *et al*, 2011). A fotossíntese realizada por plantas captura por volta de 4000 EJ/ano em forma de energia em biomassa e alimentos (KUMAR *et al*, 2010).

Podem ser consideradas fontes de biomassa de interesse energético uma variedade de recursos de origem orgânica como a madeira, culturas diversas (cana de açúcar, beterraba, soja e etc.), a palha descartada da colheita de culturas alimentícias, resíduos agrícolas e florestais, algas encontradas em seu meio natural ou cultivadas em estruturas especializadas, excrementos animais entre outros resíduos. Sua utilização direta é feita através da combustão, podendo assim alimentar, caldeiras de vapor, fornos, e etc. Porém, a biomassa pode ser processada a fim de se obter um combustível mais eficiente e versátil. Entre os processos mais comuns de conversão estão: gaseificação, pirólise, hidrólise, digestão aeróbica ou anaeróbica, fermentação, transesterificação entre outras (PALZ, 1981).

Entre os biocombustíveis produzidos nestes processos, os mais comuns são o biogás (alta porcentagem de metano), o biodiesel e o etanol, amplamente usado em transporte e geração de eletricidade.

Algumas crises de abastecimento ocorreram na década de 1970, onde o barril do petróleo teve seu preço elevado absurdamente. No Brasil, algumas medidas foram tomadas, como o Programa Nacional do Álcool (PNA), em 1975 e o Programa Nacional de Produção de Óleos Vegetais (Pró-óleo), em 1980, e deram uma nova perspectiva sobre a utilização dos biocombustíveis renováveis, incentivando sua produção em larga escala, tornando-os competitivos com os tradicionais derivados do petróleo (PEREIRA *et al*, 2012).

O biodiesel, uma dessas alternativas, é produzido a partir de óleos vegetais (comestíveis ou não) ou de gorduras animais. Uma vez que os óleos vegetais podem também ser utilizados para consumo humano, seu uso como biocombustível pode acarretar o aumento do preço de mercado, fazendo com que o custo do biodiesel aumente impedindo a sua utilização, mesmo havendo vantagens comparando com o combustível de origem fóssil (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

Inseridas nesse cenário, as microalgas constituem alternativas interessantes para produção de biodiesel, devido à sua elevada eficiência fotossintética, duplicação da biomassa em um intervalo de tempo muito curto e elevados teores de lipídeos utilizados para conversão em biodiesel (CHISTI, 2007). Os biocombustíveis que podem ser obtidos de microalgas são: o biogás, a partir da biodigestão anaeróbia da biomassa microalgal; o biodiesel, a partir do óleo da microalga e o bio-hidrogênio gasoso produzido fotobiologicamente (CORRÊA *et al*, 2017).

O cultivo desses microrganismos apresenta várias características interessantes quando comparado à cultura dos vegetais superiores, uma vez que possuem maior eficiência fotossintética e podem ser cultivadas em condições que seriam adversas a culturas convencionais (regiões desérticas; águas degradadas, salinas ou salobras, entre outras) (BENEMANN, 1997). Além disso, são eficientes na fixação de CO₂ e possuem produtividade maior em biomassa seca quando comparada com espécies vegetais. Ao final do processo de extração do óleo das microalgas para a produção de biodiesel, a biomassa residual pode ainda ser utilizada na produção de bioetanol, metano ou biofertilizantes devido à sua alta

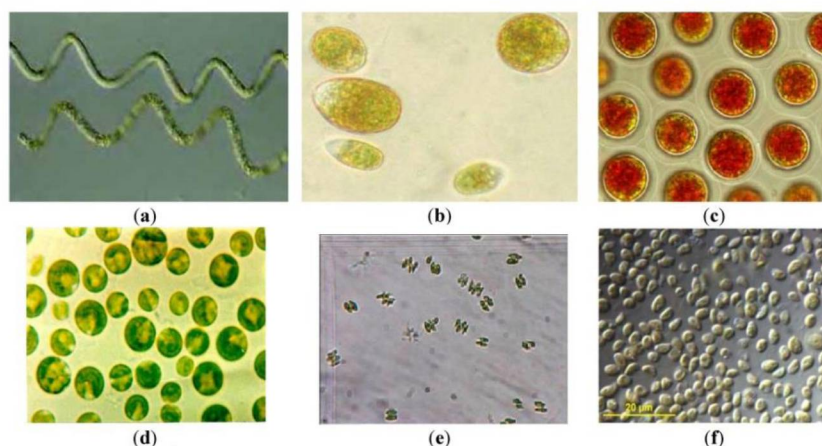
relação nitrogênio/fósforo ou, ainda, pode ser simplesmente queimada para geração de energia em sistemas de cogeração (MATA, MARTINS e CAETANO, 2010).

2.2 MICROALGAS

As microalgas (Figura 1) são organismos unicelulares fotossintetizantes, encontradas nos diversos ambientes aquáticos (marinho, pluvial/ ou lacustre). São produtores primários, atuando na conversão da energia solar em energia química, possuindo assim grande importância na cadeia trófica. Além do seu relevante papel ecológico, vem se destacando na área econômica há alguns anos, devido principalmente ao seu alto valor nutricional, produção de bioquímicos e potencialidade para a produção de biocombustíveis.

FIGURA 1 – EXEMPLOS DE ESPÉCIES DE MICROALGAS:

(a) *Arthrospira platensis* (Spirulina), (b) *Dunaliella salina*, (c) *Haematococcus pluvialis*, (d) *Chlorella vulgaris*, (e) *Acutodesmus obliquus* (f) *Nannochloropsis* sp.



FONTE: Adaptado de BENEMANN (2013); SANTOS(2016).

Na alimentação, animal e humana, as microalgas representam uma fonte suplementar de proteínas, carboidratos, ácidos graxos, pigmentos naturais (como os carotenoides), vitaminas, entre outras substâncias capazes de enriquecer o valor nutricional dos alimentos e produzir efeitos benéficos à saúde como: melhoria do sistema imunológico, fertilidade e controle do peso (DERNER *et al*, 2006). Além disso, apresentam atividades probióticas e imunomodulatórias, respostas de melhora na saúde e aparência externa dos animais (SPOLAORE *et al*, 2006).

Microalgas têm potencial para a produção de uma variedade de produtos, como pigmentos (clorofila, carotenoides, ficobilina), compostos bioativos (vários compostos antibacterianos, antifúngico, antiviral, antiprotzoário), proteínas, polissacarídeos (β 1,3-glucana, carragenana, amido, alginatos, celulose), biopoliésteres e lipídeos (poli-insaturados, ácidos graxos e hidrocarbonetos) (SANTOS, 2016).

Além da indústria alimentar, o mercado atual de microalgas também está voltado também para cosméticos e farmacêuticos. Na indústria cosmética, as algas fornecem o matéria-prima para a preparação de creme anti-rugas devido a grande concentração de ácidos graxos de cadeia longas com propriedades regenerativas (GUIL-GUERRERO *et al*, 2004).

2.2.1 Sistemas de cultivo de microalgas

2.2.1.1 Sistemas Abertos

Sistemas abertos (Figura 2) vêm sendo estudado de forma extensiva nos últimos anos e são os sistemas mais difundidos para a produção em larga escala de microalgas, como por exemplo, na produção de biomassa de *Chlorella sp.* e *Dunaliella sp.*. A disseminação deste tipo de sistema deve-se por fatores operacionais e econômicos, desde que são mais fáceis e mais baratos para construir e possuem grande capacidade de produção comparada a alguns sistemas fechados. Apesar de estes sistemas serem muito usados no nível industrial, ainda apresentam vários desafios técnicos relevantes, tais como a baixa concentração de biomassa e baixa produtividade, são suscetíveis à contaminação externas e a condições meteorológicas, especialmente flutuações na concentração de nutrientes e de células devido à evaporação e a chuva. Desta maneira o uso deste tipo de FBR é restrito às espécies de crescimento rápido ou extremófilas como a *Dunaliella sp.* (adaptada à alta salinidade), *Spirulina sp.* (adaptada à alta alcalinidade e *Chlorella sp.* (adaptada em meio rico em nutrientes) (CARLSSON, 2007). Devido ao alto risco de contaminação, combinada com dificuldades em controlar as principais variáveis como a concentração de biomassa, temperatura, pH e oxigênio dissolvido, sistemas

de cultivos abertos não são apropriados para operar em modo contínuo (MULLER-FEUGA *et al.*, 1998).

FIGURA 2 – SISTEMAS ABERTOS DE CULTIVO DE MICROALGAS
(A) lagoa tipo pista de corrida , (B) lagoa tipo circular, (C) tanque aberto.



FONTE: Adaptado de Chen *et al.* (2009).

2.2.1.2 Sistemas fechados

Em oposição aos sistemas abertos, os sistemas fechados permitem quase todos os parâmetros biotecnológicos enquanto reduz os riscos de contaminação, perdas de CO₂ e a evaporação da água. Também são mais fáceis de reproduzir as condições de cultivo, controlar a hidrodinâmica e garantem operações mais estáveis em relação à temperatura (PULZ *et al.*, 2001).

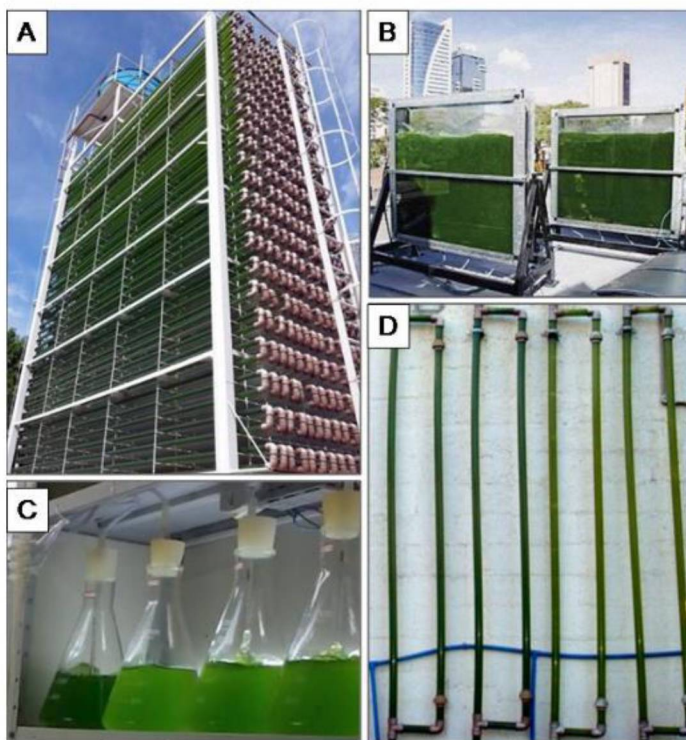
Fotobiorreatores fechados (Figura 3) são mais flexíveis e podem ser instalados tanto em ambientes abertos, expostos ao ar livre quanto em ambientes cobertos, dependendo do produto de interesse, do nível de produção requerido e do clima local. Nos últimos anos as pesquisas com FBR fechados tem crescido devido à descoberta de novos produtos provenientes de microrganismos, usados na indústria farmacêutica e de cosméticos, que devem crescer rigorosamente sem contaminantes (DRAGONE *et al.*, 2010).

O principal fundamento usado para projetar fotobiorreatores é reduzir o caminho da luz aumentando assim a disponibilidade de energia luminosa para cada célula. Deste modo a complexidade do FBR fechados são maiores do que os FBR abertos. Os valores relacionados à construção de FBR fechados ainda são elevados. Os altos custos de reatores fechados se devem, principalmente, às características dos materiais envolvidos na sua construção. Os tubos devem ser

transparentes; flexíveis e duráveis; não oferecer toxicidade; resistentes a agentes químicos, metabólitos produzidos pelas microalgas e às condições climáticas (DASGUPTA *et al*, 2010).

FIGURA 3 – SISTEMAS FECHADOS DE CULTIVO DE MICROALGAS

A) FBR tubular compacto. B) FBR placa plana. C) Frascos Erlenmeyer. D) FBR do tipo airlift.



FONTE: SANTOS (2016).

Os fotobiorreatores possuem diferentes formas de operação relacionada à retirada do produto: modo batelada, batelada alimentada, semicontínuo e contínuo. Cultivos em batelada requerem designs mais simples comparados aos realizados em modo contínuo. Cultivo em batelada é definido como o tipo de cultura onde as células são coletadas uma única vez. Na operação em batelada todo o volume do FBR contendo a biomassa é toda retirada de uma vez só, sendo necessário repor inteiramente o meio de cultivo com um novo inóculo. No cultivo contínuo, entretanto é operado baseado na diluição constante do FBR. O projeto e o uso efetivo de sistemas de cultivo contínuo são capazes de reduzir os custos de produção aproximadamente 40% comparado com o tradicional cultivo em batelada. A análise econômica é realizada embasada na taxa de alimentação e de colheita para o

sistema contínuo, enquanto o sistema batelada é analisado no rendimento médio da biomassa coletada (BENTLEY *et al*, 2008).

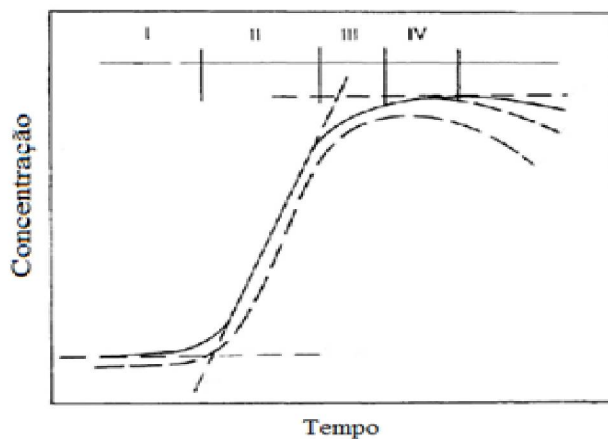
2.2.2 Modos de operação de fotobiorreatores

2.2.2.1 Crescimento em batelada

O cultivo em batelada (ou cultivo descontínuo) é a forma mais comum de produção de biomassa de microalgas. Em um sistema simples de cultivo em batelada, uma quantidade limitante de meio de cultivo e inóculo de microalgas são adicionados a um reservatório e incubados em condições ambientais adequadas para o crescimento das células. Alguma forma de agitação é necessária de modo a garantir troca de gases e nutrientes pela interface célula-água. O reservatório de cultivo pode ser um simples frasco do tipo Erlenmeyer, um tanque, uma lagoa ou ainda um fermentador controlado. A Figura 4 representa uma curva típica de crescimento de microalgas em cultivos do tipo batelada. Neste gráfico é possível observar as distintas fases do crescimento dos microrganismos que consistem em: Fase Lag (Fase de Adaptação), Fase de Crescimento Exponencial, Fase de Crescimento Linear, Fase Estacionária e Fase de declínio ou morte celular.

FIGURA 4 – CURVA DE CRESCIMENTO DE MICROALGAS:

(I) Fase lag, (II) Fase exponencial, (III) Fase de decaimento, (IV) Fase estacionária

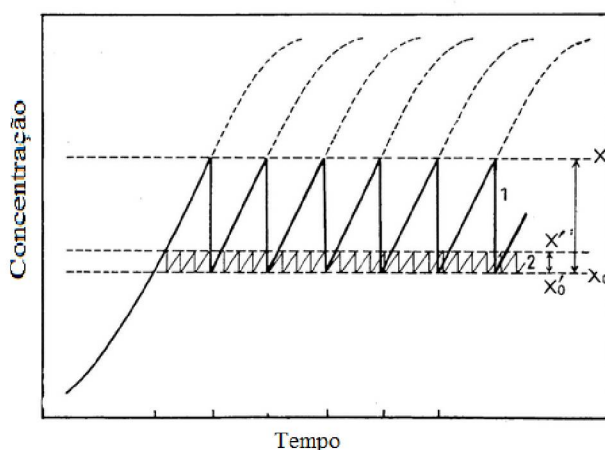


FONTE: Adaptado de Adaptado de MALÈK E FANEL (1966).

2.2.2.2 Crescimento em regime semicontínuo

Os cultivos semicontínuos propiciam grande produção de células por intervalo de tempo e garante altas produtividades em comparação ao regime batelada (SANTOS, 2016). Nesse sistema, o fotobiorreator é carregado no início do cultivo com o meio e o inóculo, sendo então incubado nas condições ótimas. Uma parcela do meio de cultivo com as algas é removida e substituída por meio de cultura novo. Isso pode ser feito a qualquer momento durante o desenvolvimento do cultivo, porém, geralmente é feito após alguns dias de crescimento, quando já se formou uma biomassa relativamente grande (LOURENÇO, 2006). A Figura 5 mostra a recuperação da concentração de biomassa após as diluições.

FIGURA 5 – CULTIVO DE MICROALGAS EM REGIME SEMI-CONTÍNUO.



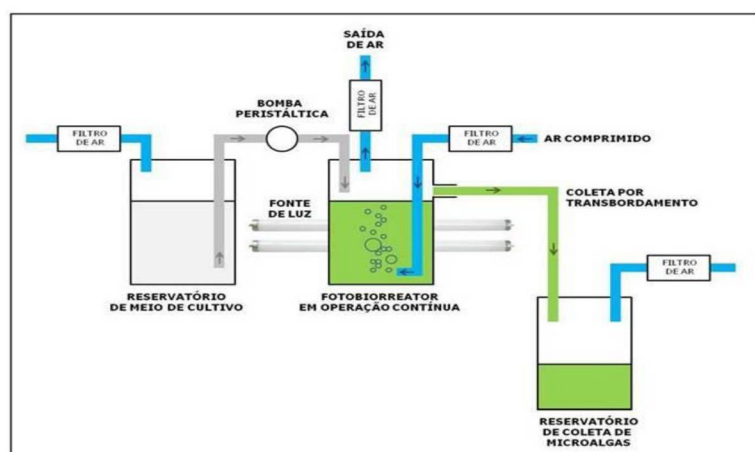
FONTE: Adaptado de MALÈK E FANEL (1966).

2.2.2.3 Crescimento em regime contínuo

Nas culturas em sistema contínuo, meio de cultivo fresco é adicionado de forma constante enquanto que a cultura com células é removida a mesma taxa de adição do meio. Essa abordagem é baseada na observação de que os substratos são consumidos do meio de cultivo enquanto há multiplicação das células e acúmulo de biomassa. Eventualmente, a cultura para de crescer devido à ausência ou limitação por algum substrato limitante ou devido à presença de inibidores de crescimento. Para manter o crescimento celular, o substrato limitante de crescimento deve ser repostado e os fatores de inibição devem ser removidos ou diluídos pela adição de meio novo (RICHMOND, 2004). De uma forma prática, assume-se que as

taxas de entrada de meio de cultivo fresco no sistema e a de retirada da cultura são iguais e, dessa forma, o volume do cultivo permanece constante. Uma bomba peristáltica é a mais adequada para introduzir o meio de cultivo fresco no cultivo, já que as partes mecânicas da bomba não entram em contato com o meio. A cultura pode ser removida por outra bomba peristáltica, ou então através da coleta por transbordamento em uma abertura na parte superior do biorreator (Figura 6).

FIGURA 6 – SISTEMA PARA CULTIVO DE MICROALGAS EM REGIME CONTÍNUO



FONTE: MARIANO (2013).

O biorreator em operação contínua visa manter o cultivo em determinada concentração celular (X) conforme a sua densidade ótica. O ponto de operação é aquele cuja taxa de crescimento específico da microalga (μ) é máximo, e se encontra na fase exponencial da curva de crescimento. A concentração celular (X) no biorreator é dada pela seguinte equação:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - DX \quad (1)$$

Onde $D = F/V$, é taxa de diluição do reator, F é a vazão de adição de substrato e V volume do cultivo. A variação da concentração celular é igual ao crescimento proporcional menos a retirada pela diluição. Em estado estacionário tem-se $dX/dt=0$, o que implica $\mu=D$, ou seja, é possível alterar a taxa de crescimento alterando a taxa de diluição do biorreator. Onde $D= F/V$, é taxa de diluição do reator.

A concentração de nutrientes (S) decresce proporcionalmente concentração celular (X) no reator é dada pela seguinte equação:

$$\frac{dS}{dt} = (S_f - S)D - \frac{\mu}{Y_{x/s}} X \quad (2)$$

Onde $Y_{s/x}$ é o fator de conversão do substrato em biomassa e S_f é a concentração do nutriente da alimentação. O modelo de Monod demonstra a influência do consumo de nutrientes pelas células sobre a taxa de crescimento específico e é descrito pela equação:

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S} \quad (3)$$

Onde μ é taxa específica de crescimento, μ_{max} a taxa específica de crescimento máxima, S a concentração de nutriente no cultivo, K_s a constante de saturação e é igual a S quando $\mu = 0,5 \mu_{max}$. De acordo com a Eq.(1), são possíveis três situações:

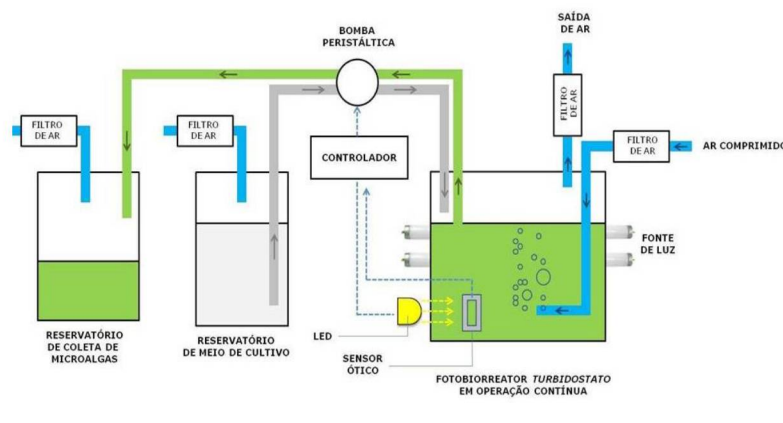
- i) se $\mu > 0$, então $\frac{dX}{dt} > 0$ e a concentração X de biomassa aumenta até se atingir um novo estado estacionário com uma maior densidade celular.
- ii) se $\mu < 0$, então $\frac{dX}{dt} < 0$ e a concentração X de biomassa diminui até se atingir um novo estado estacionário com uma menor densidade celular.
- iii) se $\mu = 0$, então $\frac{dX}{dt} = 0$ e a concentração X de biomassa mantém-se constante e o regime é estacionário.

Os métodos mais usados para realizar um cultivo em modo contínuo de microalgas são o quimiostato e o turbidostato (CUARESMA *et al*, 2011).

No quimiostato o volume do reator é constante mantendo iguais e constantes as taxas de entrada e saída: o tempo médio de permanência (inverso da taxa de diluição) é constante e atinge-se o estado estacionário por auto-ajuste da densidade

celular, devido à disponibilidade constante de meio de cultivo novo (GRIMA *et al*, 1994, TANG *et al*, 2012). O turbidostato (Figura 7) mantém uma determinada concentração de biomassa de acordo com a turbidez do cultivo. Isto é feito com a medição da densidade ótica através de um sensor. Quando a concentração desejada é alcançada é feita a diluição do cultivo. O uso do turbidostato é recomendado em situações onde: a) uma determinada concentração de células é desejada; b) existe a presença de substratos limitantes; c) baixo crescimento ou ciclos celulares complexos estão presentes, uma taxa de crescimento próxima do máximo é alcançada ou culturas que são instáveis no modo quimiostato (LEE E SHEN, 2004).

FIGURA 7 – SISTEMA DE CULTIVO CONTÍNUO TIPO TURBIDOSTATO



FONTE: MARIANO (2013).

Por exemplo, nos resultados publicados por LEE E DING (1994) nos quais os pesquisadores cultivaram a microalga *Hematococcus lacustres*, foi observado um efeito de lavagem (diminuição abrupta da concentração de células no reator). Nestes experimentos foram utilizados uma taxa de diluição fixa num quimiostato. Todavia, como a taxa de crescimento específica da *H. lacustres* varia ao longo do seu ciclo de vida já que esta microalga possui distintas fases de reprodução (sexuada e assexuada), ou uso de uma taxa de diluição constante no quimiostato provoca um efeito de lavagem nos fotobiorreatores. Nestes casos recomenda-se o uso de turbidostatos, ou seja, sistemas que monitorem a concentração celular. O turbidostato é amplamente usado para cultivos contínuos (TANG *et al*, 2012), mas é uma técnica mais complexa e possui mais dificuldades do que o quimiostato (SANDNESS *et al*, 2006). No sistema de turbidostato um sistema automático

composto por sensores ópticos (para captar a turbidez do cultivo) e bombas realização a diluição ajustando a turbidez, consequentemente a concentração de biomassa desejada, no biorreator. Geralmente o ajuste da taxa de adição de meio é feita por controle por realimentação (LEE E SHEN, 2004).

2.2.3 Aplicações biotecnológicas de cultivos em regime contínuo

A aplicação do cultivo contínuo de microalgas pode estar voltada tanto como estratégia de produção quanto como ferramenta de pesquisa. Como estratégia de produção, ela visa o aumento da viabilidade do processo industrial e está relacionada com: a redução dos custos operacionais (reduzir o espaço ocupado, aumentar o nível de automação, diminuir os custos de recuperação da biomassa).

Entre as características inerentes ao cultivo em modo contínuo, as que justificam seu uso como ferramenta de pesquisa, na área de fisiologia, ecologia, genética e bioquímica (HOSKISSON E HOBSS, 2005), está: a possibilidade de estabelecer e controlar a taxa de crescimento específica; selecionar e controlar o estado metabólico; possibilidade de obter quantidade significativa de células com propriedades predefinidas através de um FBR escala laboratorial; variáveis independentes (temperatura, pH, taxa de crescimento entre outras) podem ser manipuladas uma de cada vez; possibilidade de escolher uma ou combinações de substratos limitantes e condições físico-químicas definidas e controláveis (TANG *et al*, 2012). Inúmeros trabalhos relacionados ao efeito da concentração de nutrientes (macronutrientes com nitrogênio e fosfatos e metais traço com o ferro, por exemplo) na fisiologia, metabolismo e composição bioquímica de organismos fotossintetizantes foram realizados nos últimos anos com o auxílio de sistemas de cultivo contínuo. Além da concentração de nutrientes, a influência da salinidade, qualidade e quantidade da luz, concentração inicial da biomassa, turbidez do cultivo, temperatura, idade do cultivo e taxas de diluição foram estudadas usando cultivos contínuos (FERNANDES *et al.*, 2015).

UTIKILEN E GJØLME (1992) estudaram num FBR contínuo os efeitos da intensidade e qualidade de luz na produção de toxinas pela cianobactéria *Microcystis aeruginosa*. LAMERS e colaboradores (2010) usaram um turbidostato para testar os mesmos efeitos no metabolismo de carotenoides e ácidos graxos da

microalga *Dunaliella salina*. A influência da taxa de diluição na dinâmica de crescimento da *Spirulina platensis* durante um cultivo contínuo foi avaliada por SASSANO e colaboradores. SOBCZUK E CHISTI (2010) testaram o efeito da diluição e temperatura na porcentagem de lipídeos e perfis de ácido graxo. Um turbidostato e um quimiostato forma usados por MAEDA e colaboradores (2006) para avaliar o efeito da turbidez na produção de amidos pela microalga *Chlamydomonas sp.*

Cultivos contínuos em escala de laboratório podem ser usados também como ferramenta de desenvolvimento e caracterização de novos processos fotoautotróficos, desde que este tipo de cultivo permite a otimização de fatores individuais mantendo outros parâmetros constantes, por exemplo, a *Spirulina platensis* foi cultivada em modo contínuo para projetar e avaliar o processo de recuperação e tratamento desta espécie, para ser usada como fonte alimentícia (MORIST *et al*, 2001).

Outra aplicação comum e amplamente estudada de cultivos contínuos de microalgas é a remoção de nutrientes, contaminantes orgânicos e metais pesados de águas degradadas, onde a utilização destes microrganismos apresentam algumas vantagens como a produção de compostos com valor agregado e produção de oxigênio proveniente da fotossíntese, necessários para bactérias que biodegradam os poluentes perigosos por digestão aeróbica. Dependendo da composição e da sensibilidade dos microrganismos empregados, existem basicamente duas abordagens: FBR agitado com células livres e recirculação de biomassa com o objetivo de evitar o efeito intoxicante (MUÑOZ E GUIEYSSE, 2006); e células imobilizadas, que garantem altos graus de purificação e simples operação do processo (AKSU, 1998). Cultivos em modo contínuo são adequados para o tratamento de efluentes, por que esta técnica permite um uso eficiente das misturas de substratos e culturas e remove os substratos limitantes, neste caso o poluentes, do meio de cultivo (MCGINN *et al.*, 2012).

O uso de cultivos contínuos no tratamento de águas degradadas permite o uso de substâncias tóxicas, desde que este modo de operação reduz o efeito inibitório dos compostos tóxicos por causa da baixa concentração por célula (devido à alta concentração celular) e curto tempo de contato entre as células e estes compostos.

Dentre as espécies que são reportadas como aplicáveis no tratamento de águas degradadas estão as espécies *Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp. e *Chlamydomonas reinhardtii* (PARK *et al.*, 2011; KONG *et al.*, 2010). A remoção de íons metálicos como alumínio, cálcio, ferro, manganês e magnésio possui valores variados de acordo com as diversas espécies estudadas, alcançando de 50 % á 99% (WOERTZ *et al.*, 2001).

A utilização de microalgas como matéria prima para bioquímicos e biocombustíveis é a mais promissora aplicação para este tipo de biomassa. Cultivos contínuos fotoautotróficos vêm sendo testado como estratégia eficiente na produção de produtos de alto valor agregado como, por exemplo, a astaxantina. DEL-RÍO e colaboradores (2005) demonstraram a viabilidade da produção contínua de astaxantina através de cultivos contínuos da microalga *Hematococcus pluvialis* em um FBR tipo colunas de bolhas alcançando altas produtividades de astaxantina (5,6 mg L⁻¹ d⁻¹). Também foi demonstrado a produção de astaxantina a partir do cultivo contínuo de *Hematococcus pluvialis* em FBR tubular de 25 m³ (GUEDES *et al.*, 2011; OLAIZOLA *et al.*, 2000). A produção contínua de outros produtos de alto valor agregado como antibióticos pela cyanobactéria *Scytonema* sp. (CHETSUMON *et al.*, 1995), ácido docosa-hexaenoico usando a microalga *Schizochytrium* sp. (GANUZA E IZQUIERDO, 2007); beta caroteno da microalga *Dunaliella salina* (KLEINEGRIS *et al.*, 2011) e luteína da microalga *Muriellopsis* sp., têm sido realizada com alta performance.

Recentemente WEN e colaboradores (2014) testaram o efeito da concentração de nitratos na produtividade de lipídeos da microalga *Chlorella pyrenoidosa*, enquanto SOBCZUK E CHISTI (2010) avaliaram o efeito da temperatura e da taxa de diluição na produtividade de lipídeos da *C. minor*. Também é possível a produção de hidrogênio molecular através de cultivo continuo da cyanobactéria *Anabaena variabilis* (MARKOV, 1993).

2.2.4 Biocombustíveis á partir da biomassa de microalgas

O processamento da biomassa de microalgas para obtenção de biocombustíveis possui algumas etapas mostradas na Figura 8. Após o cultivo, a biomassa é coletada e então é feita a separação. Pode ser realizada filtragem,

centrifugação, floculação entre outras técnicas. Após a separação ocorre a secagem por meio de secagem solar, liofilização, spray-drying ou até fluxo competitivo. Depois da secagem ela está apta para o processo de extração dos lipídios. A extração do óleo da biomassa, geralmente por prensagem mecânica ou extração usando solventes. O óleo extraído é usado para produzir biodiesel enquanto a biomassa restante pode ser usada para outras finalidades (AHMAD *et al.*, 2010).

A conversão de microalgas para biocombustível pode ser classificada como um processo de conversão bioquímica ou termoquímica. Os processos de conversão bioquímicos são a transesterificação e a fermentação, que produzem o biodiesel e etanol como os principais produtos, respectivamente.

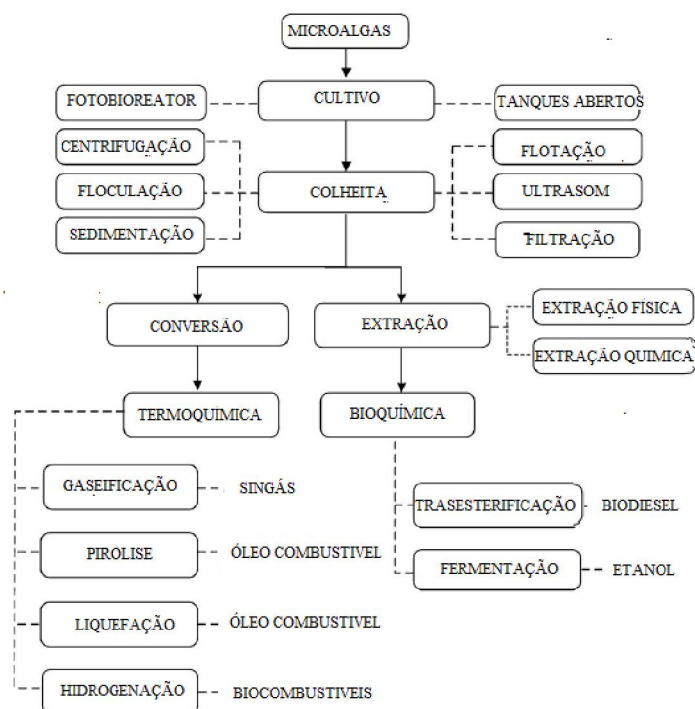
Os processos termoquímicos são a pirólise, liquefação, a gaseificação e a hidrogenação. Os processos de pirólise e de liquefação produzem óleo combustível, ao passo que a gaseificação produz gás (gás de síntese) e hidrogenação é um processo para melhorar as propriedades de biocombustíveis ou como matéria-prima.

A principal dificuldade atualmente para obtenção de combustível renovável (biohidrogênio, etanol, biodiesel), em comparação ao combustível fóssil obtido diretamente da extração mineral, é que sistemas energeticamente eficientes devem ser implementados para atender à demanda, de tal maneira que o balanço de energia seja compensador. Sistemas de cogeração, trigeração ou multigeração são alternativas possíveis a serem seguidas a fim de atingir esse objetivo (VARGAS *et al.*, 2014).

2.2.4.1 Biodiesel de microalgas

O biodiesel é um dos biocombustíveis mais conhecidos de microalgas e têm sido discutidas exaustivamente na literatura (CHIST, 2008). O biodiesel é produzido por transesterificação com glicerol como um produto secundário. Com base em dados recentes, algumas espécies de microalgas acumulam até 73,4% de lipídios, tendo como principal componente os triglicerídeos (LYANG *et al.*, 2010; ZHU *et al.*, 2007); estes podem ser convertidos em biodiesel por meio de uma reação de transesterificação (Figura 9).

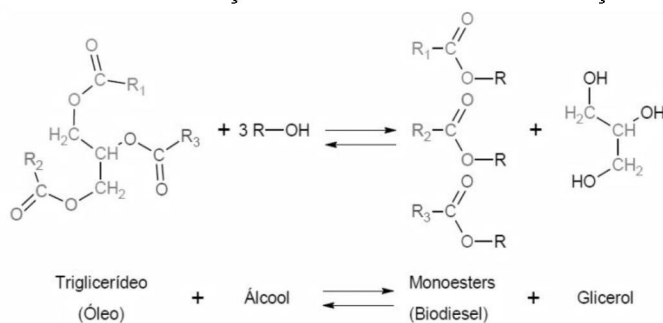
FIGURA 8 – ETAPAS DE TRANSFORMAÇÃO DE BIOMASSA DE MICROALGAS EM BIOCOMBUSTÍVEIS



FONTE: SUALI E SARBATLY (2012).

O custo estimado do biodiesel produzido a partir óleo de microalgas é de US \$ 3,69-4,20 por galão (POKOO-AIKINS *et al.*, 2010). O processo de transesterificação ocorre num reator em que o metanol e o catalisador são misturados e reagem com os triglicerídeos presentes no óleo de algas.

FIGURA 9– REAÇÃO DE TRANSESTEREFICAÇÃO



FONTE: Torrens *et al*, 2010.

O produto formado é bombeado para um tanque separador. Quando se utiliza um catalisador de base ou ácido, a camada superior é dominada por éster metílico, o excesso de álcool e o catalisador, enquanto o nível mais baixo é dominado pelo

glicerol (GUAN *et al.*, 2004). A proporção de óleo e metanol pode ser determinada através da realização de um experimento em escala de laboratório antes de avançar em escalas maiores para evitar o excesso de metanol.

Há também a síntese enzimática através de lipases fúngicas, e se mostra muito eficiente para várias conversões de óleo vegetal em éster metílico, com rendimentos de superiores a 90% de óleo bruto em biodiesel (TAHER, 2013).

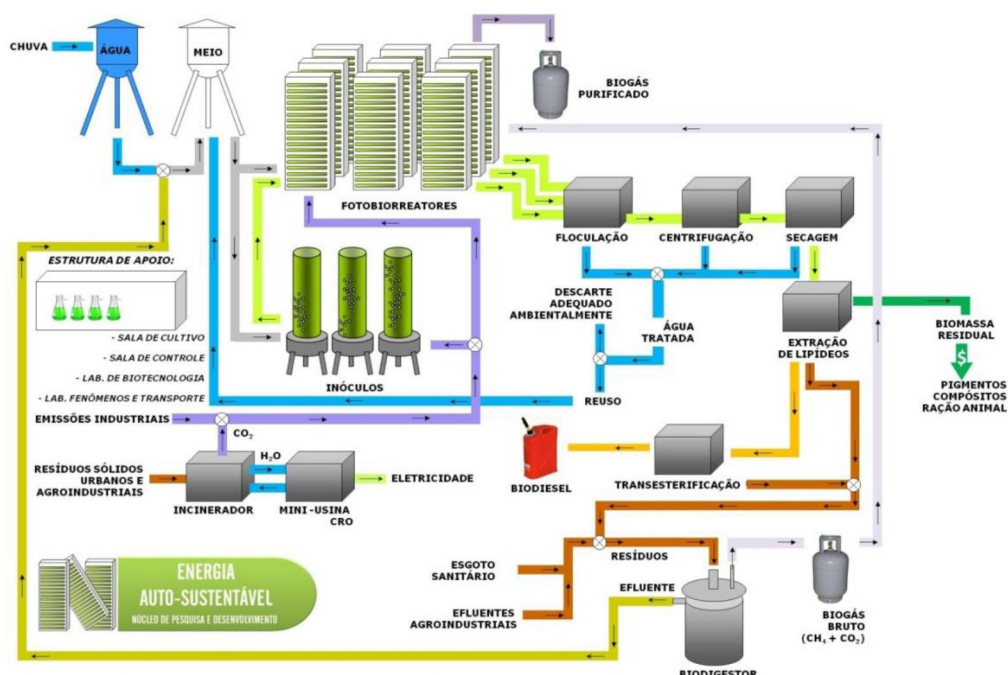
Ao final do processo de extração do óleo das microalgas para a produção de biodiesel, a biomassa residual pode ainda ser utilizada na produção de bioetanol, metano ou biofertilizantes devido à sua alta relação nitrogênio/fósforo ou, ainda, pode ser simplesmente queimada para geração de energia em sistemas de cogeração (SINGH e GU, 2010; MATA, MARTINS e CAETANO, 2010).

Também podem ser exploradas as seguintes aplicações: agentes de enchimento em polímeros para desenvolver materiais compósitos, ou possivelmente, como aditivos para o solo depois de carbonizados (SATYANARAYANA; MARIANO; VARGAS, 2009).

2.2.5 Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável

O Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável (NPDEAS) estabeleceu-se como referência no desenvolvimento de fotobiorreatores para produção de biomassa de microalgas. O núcleo conta com todas as etapas produtivas, desde a coleta de microalgas e manutenção de cepas até o processamento e produção final do óleo obtido das microalgas. Primeiramente, os micro-organismos são cultivados em escala laboratorial para a produção de pré-inóculo. Gradativamente a produção é escalonada até se estabelecer o cultivo nos fotobiorreatores. Após a coleta, a biomassa de microalga é seca para posterior extração dos lipídeos. Os resíduos dos cultivos são reaproveitados através de um biodigestor para a produção de biogás. A Figura 10 mostra um fluxograma das operações realizadas no NPDEAS. Os fotobiorreatores situados no NPDEAS são compostos por tubos de PVC transparentes e cada um possui volume de 10 m³. Os cultivos são desenvolvidos com meios variados, a aeração é realizada por compressores industriais e a circulação do cultivo é feita através de bombas centrífugas.

FIGURA 10– FLUXOGRAMA DAS ATIVIDADES REALIZADAS NO NPDEAS.



FONTE: Adaptado de Satyanarayana, Mariano e Vargas (2011).

Além de serem usados para produção de biomassa e tratamento de efluentes líquidos, os fotobiorreatores do NPDEAS podem ser usados para tratamento de emissões devido à alta eficiência em aproveitamento de gases dos trocadores desenvolvidos e instalados no equipamento e permitindo, desta forma, a utilização em diversos setores produtivos para agregar valores a processos ou mitigar efeitos adversos ao ambiente.

2.3 AUTOMAÇÃO E CONTROLE DE FOTOBIORREATORES

Na pesquisa e desenvolvimento de fotobiorreatores, a tendência aponta para o desenvolvimento de sistemas automatizados de agitação, aeração, colheita e filtração, mediante a instalação de sensores para avaliação da produtividade do cultivo. Quanto maior o valor de um produto biotecnológico maior é a demanda por uma qualidade constante e excelência do produto. As consequências destas demandas para o processo de engenharia, o controle da qualidade e também o controle das condições são uma necessidade crescente de aumentar a segurança do produto, a reprodutibilidade das etapas de produção e diminuir a poluição do meio ambiente. Em muitos casos de acidentes nas indústrias químicas foram devido

a erros humanos, sendo este a maior limitação para alcançar objetivos maiores. Um melhor processamento pode ser realizado com o aumento do conhecimento fisiológico e bioquímico das reações e com a aplicação do controle automático nos processos biotecnológicos.

Os primeiros sistemas para medições e controle de biorreatores foram introduzidos em meados dos anos 60 do século passado. As variáveis físicas mais simples (temperatura, velocidade de agitação, taxa de aeração) foram progressivamente complementadas pelas medidas de propriedades químicas (pH, concentrações de oxigênio dissolvido, análise de gases e etc.). Atualmente, uma grande gama de sensores e equipamentos estão disponíveis para equipar biorreatores. Mas algumas variáveis biológicas tais como biomassa, concentração de substratos e acúmulo de metabólitos geralmente não são medidos em tempo real. O método habitual é a coletas de pequenas amostras a determinados intervalos de tempo e são feitas técnicas diversas através métodos mais precisos e equipamentos analíticos de alto desempenho, como por exemplo, cromatógrafos líquidos ou gasosos, biosensores entre outros. Porém, alguns destes equipamentos podem exigir altos investimentos e também necessitar manutenção periódica.

Os processos de produção que envolve microorganismos, geralmente requer controle para manter a operação em ponto ótimo, com o intuito de aumentar a produtividade. O uso de medições de inúmeras variáveis do processo permite um rigoroso controle e monitoramento do processo. Varias técnicas tem sido desenvolvidas para as medições *online* da densidade de células e a estimativa de sua concentração, a maioria delas são baseadas em turbidimetria e espectrofotometria, ou através das propriedades eletro-químicas das culturas como resistência e capacitância, medidas por eletrodo inseridos no interior do reator (SALGADO *et al.*, 2001).

As tecnologias necessárias para monitorar o cultivo de microalgas devem ser resistentes às condições de operação da unidade e propiciar o registro de informações das variáveis de processo, bem como ser capaz de processá-las. Esse conjunto composto pelos sensores, fiação, cabeamento, alimentação elétrica e unidade de gerenciamento deve ter, preferencialmente, sua concepção, projeto e tecnologia conhecidos e acessíveis pelos interessados na operação da planta de produção de microalgas (FILHO, 2014).

A instrumentação remota e virtual se tornou muito popular e acessível nos últimos. Diversos trabalhos são desenvolvidos em soluções baseadas em microcontroladores e computadores de baixo custo em aquisição de dados e controle. Dentre inúmeras aplicações de plataformas de prototipagem estão: o uso em experimentação remota sistemas físicos educacionais, como plantas térmicas, levitação magnética e um sistema de tanque hidráulico (KALÚS *et al*, 2014), um planta experimental de energia renovável (DELAY, 2014), a criação de rede de sensores sem fio (GEORGITZIKIS *et al*, 2012).

2.3.1 Monitoramento

Monitorar os parâmetros do processo é geralmente realizado por sensores conectados a sistemas de aquisição de dados, os quais podem ser equipamentos adaptados de outros processos, disponíveis comercialmente, ou através de desenvolvimento de projetos específicos. Podem-se dividir os principais parâmetros a serem monitorados em um FBR em três classes: físicos (incidência luminosa, temperatura, agitação), químicos (CO_2 e O_2 dissolvidos, pH, concentrações de substrato e produtos) e biológicos (concentração da biomassa, morfologia das células, estado fisiológico e eficiência fotossintética).

Outros parâmetros importantes como pH, oxigênio dissolvido, temperatura e concentração de CO_2 também são controláveis com sensores específicos (Tabela 1). A automação dos sistemas vem contribuindo aos poucos para alcançar valores na ordem de 5 a 10 g.L⁻¹ de biomassa para várias espécies (LOURENÇO, 2006). Monitorar estas variáveis permite determinar importantes parâmetros do cultivo como taxas de crescimento, a eficiência da fotossíntese e também são úteis na elaboração de modelos de crescimento das microalgas, produtos formados e consumo dos nutrientes.

O monitoramento dos parâmetros biológicos, físicos e químicos devem ser preferencialmente realizada *in-situ* e *online*, entretanto devido algumas especificidades e limitações associadas a algumas técnicas, análises *offline* são amplamente usadas, apesar de serem abordagem mais complexas e demandarem mais tempo (GOVEIA *et al.*, 2009).

TABELA 1 – SENSORES E EQUIPAMENTOS USADOS PARA MEDIÇÕES EM BIORREATORES.

Parâmetro	Método de monitoramento		Referências
	Sensor/Técnica	Offline/Online	
	a		
pH	pHmetro	Online	Meireles <i>et al</i> (2008); Tang <i>et al</i> (2012).
Densidade de fluxo de fótons	Sensor de quantum	Online	Cuaresma <i>et al</i> (2009); Berenguel <i>et al</i> (2004).
	Fibra óptica	Online	Fernandes <i>et al</i> (2014)
O₂	Sensor de O ₂	Online	Lívanský <i>et al</i> (2006); Scherholz and Curtis (2013).
	Analizador de O ₂	Online/offline	Lívanský <i>et al</i> (2006); Scherholz and Curtis (2013).
CO₂	Sensor de CO ₂	Online	Masojídek <i>et al</i> (2008); López <i>et al</i> (2006).
	Analizador de CO ₂	Online/offline	Berenguel <i>et al</i> (2004); Nedbal <i>et al</i> (2010); Meiser <i>et al</i> (2004).
Concentração de biomassa	Espectrofotometria	Offline	Camacho <i>et al</i> (1990); Tang <i>et al</i> (2012); Lívanský <i>et al</i> (2006).
		Offline	Camacho <i>et al</i> (1990); Tang <i>et al</i> (2012); Castellanos (2013).
	Contagem de células	Offline	Castellanos (2013); Hulatt and Thomas (2011); Córdoba—Matson <i>et al</i> (2009)
	Sensor de densidade óptica	Online	Sandnes <i>et al</i> (2006); Nedbal <i>et al</i> (2008)
	FIA+ espectrofotômetro	Online	Pruvost <i>et al</i> (2011)
	Softsensor	Online	Li <i>et al</i> (2003); Su <i>et al</i> (2003); Jung and Lee (2006)
	Sonda Turbidímetro	Online	Briassoulis <i>et al</i> (2010) .

FONTE: O AUTOR (2017).

A medição das variáveis biológicas, incluindo concentração celular, tamanho de células, morfologia, composição da população (já que existe a possibilidade de contaminação por protozoários, bactérias e fungos), pigmentos e lipídeos, são especialmente desejáveis porque eles são indicadores diretos das dinâmicas do

sistema de cultivo. Os métodos padrões de análise dessas variáveis envolvem processos laboriosos e destrutivos, não sendo possível aplicar tais metodologias para acompanhamento em tempo real e em técnicas de controle.

Em situações reais, o monitoramento contínuo, *online* e direto de certos compostos, como os produtos intracelulares, ou propriedades da biomassa, não é prático e em alguns casos, possível. Para superar estes problemas, medidas discretas são usadas com modelos matemáticos, ou estimadores, que descrevem o bioprocessos e podem ser associadas com um parâmetro indireto: pH, oxigênio dissolvido ou irradiância entre outros. A principal vantagem desta abordagem é que tais parâmetros são medidos com uma frequência elevada permitindo assim medidas discretas e monitoramento e controle indireto. Esta estratégia de aliar sensores e modelos matemáticos é amplamente usada em bioprocessos e são chamados de *softsensors* (sensores por software). Os modelos matemáticos de crescimento de microalgas são, na maioria dos casos complexos, já que além de considerar os parâmetros principais relacionados a cinética de crescimento, também incluem variáveis relacionada a luz fornecida ao cultivo tais como, autossombreamento, fotolimitação e fotosaturação.

Entre os modelos mais usados na descrição do crescimento de microrganismos são baseados em equações modificadas dos modelos de Monod ou o modelo de Droop. Na maioria dos casos, os *softsensors* desenvolvidos visam à estimação da concentração de biomassa usando modelos que relacionam a concentração de biomassa com diferentes parâmetros de crescimento tais como: pH (BERENGUEL *et al.*, 2004), oxigênio dissolvido (LI *et al.*, 2003), irradiância local (SU *et al.*, 2003), radiação solar (QUINN *et al.*, 2011), e análise de imagens (CÓDORBA-MATSON *et al.*, 2009). Devido à complexidade envolvida nos modelos que consideram inúmeros parâmetros, modelos que visam à estimação da composição da biomassa são poucos comuns, geralmente usados em processos onde condições nutricionais específicas são exigidas.

As técnicas de controle e monitoramento são importantes em todos os processos de cultivos de microrganismos, mas eles são inevitáveis quando o modo de cultivo contínuo é utilizado, devido à necessidade de manter constantes as condições de cultivo. Microalgas apresentam algumas dificuldades adicionais para monitoramento e controle, quando feitos em larga escala, que aumentam as

dificuldades de agitação e contaminação e também o fato que os produtos de interesse estão no interior da célula (HAVILIK *et al.*, 2013).

De um ponto de vista econômico, a aplicação de monitoramento e controle automáticos não só reduziria custos operacionais pela redução do impacto de trabalho e também a quantidade de efluentes, além de promover a qualidade do produto (LEE, 1995), permitindo assim a operação do FBR de modo estável por longos períodos.

2.3.2 Sensores para determinação de biomassa

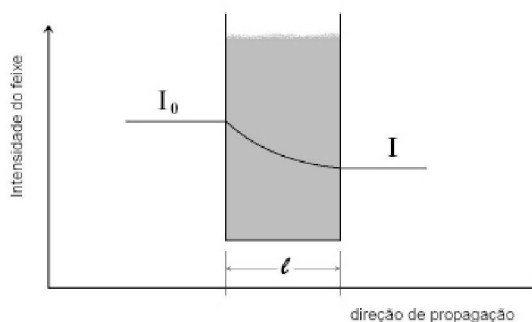
As técnicas baseadas em espectrofotometria vêm sendo amplamente usadas para a estimação de variáveis biológicas acima citadas pela medição da absorbância, turbidez e fluorescência da cultura. Como tais técnicas podem ser realizadas de forma não destrutiva e rápida, elas se tornam as mais indicadas para monitoramento *online* e controle de fotobiorreatores. Existem diversos sensores comerciais para aferir a concentração de biomassa, porém, muitos deles são desenvolvidos para monitorar culturas de microalgas em níveis muito baixo das faixas observadas nas aplicações de produção em larga escala. Entretanto na maioria dos casos, tais sensores apresentam custos elevados em aplicações de produtos de baixo valor agregado. Existem diversos estudos voltados para o desenvolvimento e avaliação de sensores construídos pelos próprios pesquisadores em suas aplicações (MELLO; VARGAS; MARIANO, 2009).

Quando a luz visível incide sob qualquer corpo ou solução, uma parte é refletida, outra absorvida e outra ainda, transmitida. A relação entre a intensidade luz incidente (I_0) e a luz transmitida (I) podem ser demonstradas no diagrama da Figura 11.

O feixe de luz incide sob a cubeta onde o cultivo microalgas flui do FBR, ao longo do caminho óptico a cultura espalha a radiação luminosa, diminuindo progressivamente de intensidade. Quando emerge do lado oposto da fonte luminosa a intensidade I é menor que a incidente (I_0). Define-se transmitância como a razão entre a intensidade luz transmitida e a luz incidente e é dada pela seguinte equação:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (4)$$

FIGURA 11– ATENUAÇÃO DA INTENSIDADE LUMINOSA ATRAVÉS DE UMA AMOSTRA



FONTE: GALO E COLOMBO (2009).

A transmitância geralmente é expressa em porcentagem. Chama-se absorvância (também conhecida como extinção ou densidade ótica) o logaritmo negativo da transmitância. A absorvância é um parâmetro mais adequado, porque existe uma relação linear (numa determinada faixa) entre ela e a concentração de biomassa no cultivo, o que não ocorre com a transmitância. A absorvância (A) da amostra é dada pela equação:

$$A = -\ln \frac{I}{I_0} = \varepsilon_{\lambda} \cdot \ell \cdot C \quad (5)$$

Esta expressão é conhecida como Lei de Beer-Lambert, onde ε_{λ} é o coeficiente de extinção molar da amostra para radiação de comprimento de onda λ , ℓ é comprimento do caminho óptico e C a concentração da substância a ser quantificada na amostra.

SANDES e colaboradores (2010) desenvolveram um sensor baseado na medição da luz através de um tubo transparente de 10 mm de caminho óptico usado num fotobiorreator vertical através de um LED emissor de comprimento de onda de 880nm e um fotodiodo montados em lados opostos do tubo e é capaz de estimar a concentração de *Nannochloropsis oceanica* e correlacionar com a concentração de biomassa seca. BRIASSOULIS e colaboradores (2008) desenvolveram um sistema automatizado de sensoriamento de densidade em célula de fluxo e colheita. Os LEDs alinhados com os fotosensores são usados para medir a transmitância de luz da cultura de microalgas nos comprimentos de ondas de 470, 518, 630 e 940nm. Uma rede neural foi usada para estimar a concentração de biomassa pela associação das medidas de tensão de cada fotosensor com a concentração obtida

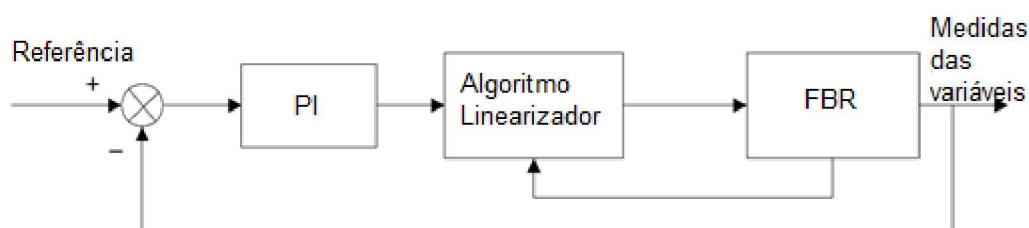
por contagem de células. O sensor apresentou um erro absoluto de estimação abaixo de $8 \cdot 10^6$ células e erro máximo de 9% dentro de um intervalo de 5 a $145 \cdot 10^6$ células. mL^{-1} .

2.3.3 Controle

O controle de fotobiorreatores é uma área que tem ganhado importância nos últimos anos devido à possibilidade de aumento da produção de biomassa de microalgas. O principal objetivo de controlar o processo de cultivo é garantir que o biorreator forneça uma quantidade desejada de biomassa por longos períodos de tempo (BACERRA-CELIS *et al*, 2008).

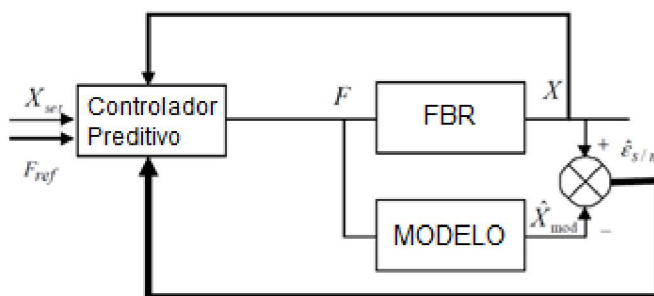
O controle de fotobiorreatores de microalgas são geralmente feitos através de controles *feedback* (realimentação) e *feedforward* (antecipatório). Controle *feedback* (Figura 12) é feito através da medição da variável do processo que é comparada com o valor de referencia, efetuando assim alterações nas variáveis de entrada com o objetivo de variável do processo se aproxime ao máximo do valor de referência (FONSECA E TEIXEIRA, 2007). No controle tipo *feedforward* (Figura 13), modelos matemáticos atuam como estimadores: avaliam o estado atual do processo e prevêm o resultado, caso necessário calculam uma ação de controle para manter o cultivo num estado predeterminado (FONSECA E TEXEIRA, 2007; TOROGHI *et al*, 2013). É comum a implementação do controle *feedforward* como técnica adicional à técnica de *feedback*. Nestas situações a parte de controle *feedforward* controla os distúrbios maiores, enquanto a parte *feedback* controla quaisquer outras variações que poderiam causar o desvio da variável de processos do valor de referência. Em sistemas de controle sempre existem variáveis do processo que são monitoradas (pH e concentração da biomassa e etc.) e variáveis independentes e manipuláveis (injeção de CO_2 , taxas de diluição, intensidade de luz entre outras).

FIGURA 12 – CONTROLE TIPO REALIMENTADO

FONTE: BECERRA-CELIS *et al.* (2008).

Usualmente o controle de pH é feito por controle *feedback*, quando o valor de pH aumenta e ultrapassa o valor de referência, CO₂ ou um ácido é adicionado no cultivo com o objetivo de diminuir o valor do pH (FERNANDEZ *et al.*, 2014 ; LOBIÈRE., 2009). O controle do pH através da injeção de CO₂ é um dos métodos mais comuns, principalmente por ser também fonte de carbono inorgânico.

FIGURA 13– CONTROLE TIPO ANTECIPATÓRIO

FONTE: BECERRA-CELIS *et al.* (2008).

Geralmente, controle da biomassa através da técnica de *feedback* são aplicadas em sistemas de cultivo em modo batelada ou semi-contínuo (MEIRELES *et al.*, 2008; SADNESS *et al.*, 2006), enquanto controles tipo *feedforward* são propostos para sistemas de cultivo contínuo (BAQUERISSE *et al.*, 1999 ; BACERRA-CELIS *et al.*, 2008; QUINN *et al.*, 2011). As principais estratégias para controlar a concentração biomassa no biorreator são do tipo *feedback* baseadas em técnicas de espectrofotometria (MEIRELES *et al.*, 2008; SADNESS *et al.*, 2006), do tipo *feedforward* baseadas na vazão de entrada de meio de cultivo (ABDOLLAHI E DUBLJEVIC, 2012; BACERRA-CELIS *et al.*, 2008) ou controle conjunto (*feedback* e *feedforward*) utilizando a vazão de injeção de CO₂ de acordo com o regime da intensidade de iluminação (BUEHNER *et al.*, 2009).

TABELA 2– ESTRATÉGIAS DE CONTROLE PARA FOTOBIORREATORES

Parâmetro controlado	Variável manipulada	Tipo de controle	Referências
<i>pH</i>	Vazão de CO ₂	<i>Feedback</i>	Becerra-Celis <i>et al</i> (2008); Moreno <i>et al</i> (1998); Meiser <i>et al</i> (2004)
		<i>Feedback e feedforward</i>	Berenguel <i>et al</i> (2004); Buehner <i>et al</i> (2009).
	Adição de ácido/base	<i>Feedback</i>	Castellanos (2013); Jácome-Pilco <i>et al</i> (2009).
<i>Concentração de biomassa</i>	Taxa de diluição	<i>Feedback</i>	Loubière <i>et al</i> (2009); Sandnes <i>et al</i> (2006).
		<i>Feedback e feedforward</i>	Becerra-Celis <i>et al</i> (2008)
	Intensidade luminosa	<i>Feedback</i>	Carvalho and Malcata (2005)
	CO ₂ + Intensidade luminosa	<i>Feedback e feedforward</i>	Moreno <i>et al</i> (1998); Gouveia <i>et al</i> (2009).

FONTE: Adaptado de FERNANDES *et al.* (2015).

3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Com base na revisão bibliográfica foram identificadas as seguintes lacunas no estado da arte em automação de fotobiorreatores:

- a) Sistemas de controle simples e eficientes para promover crescimento em regime contínuo.
- b) Métodos em geral que aumentem a produtividade de cultivos de microalga a fim de melhorar a competitividade da biomassa de microalgas no mercado com os outros tipos de biomassa.

O acompanhamento dos cultivos é geralmente realizado através de análises *offline*, ou seja, é necessária a retirada de amostras e análises posteriores. A possibilidade de monitorar o cultivo em fotobiorreator de modo *online* implica em um aumento de conhecimento do processo, pois é feito a aquisição e armazenamento das variáveis do bioprocessamento como concentração de biomassa, pH, temperaturas, iluminâncias, dentre outras, podendo usa-la para a determinação das dinâmicas do fotobiorreator.

A implementação de tecnologias de controle e automação para a operação dos fotobiorreatores é um pré-requisito para o cultivo em regime contínuo de microalgas, que se apresenta como uma solução em potencial para aumentar a produtividade e diminuir as dificuldades inerentes dos sistemas batelada como falta de nutriente e pouca iluminação no período final decorrente do sombreamento imposto pelo maior número de células.

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a produtividade de biomassa de microalgas em fotobiorreatores operando em regime contínuo através da implementação de automação em fotobiorreatores, a partir do desenvolvimento de controladores e sensores para determinação da concentração celular.

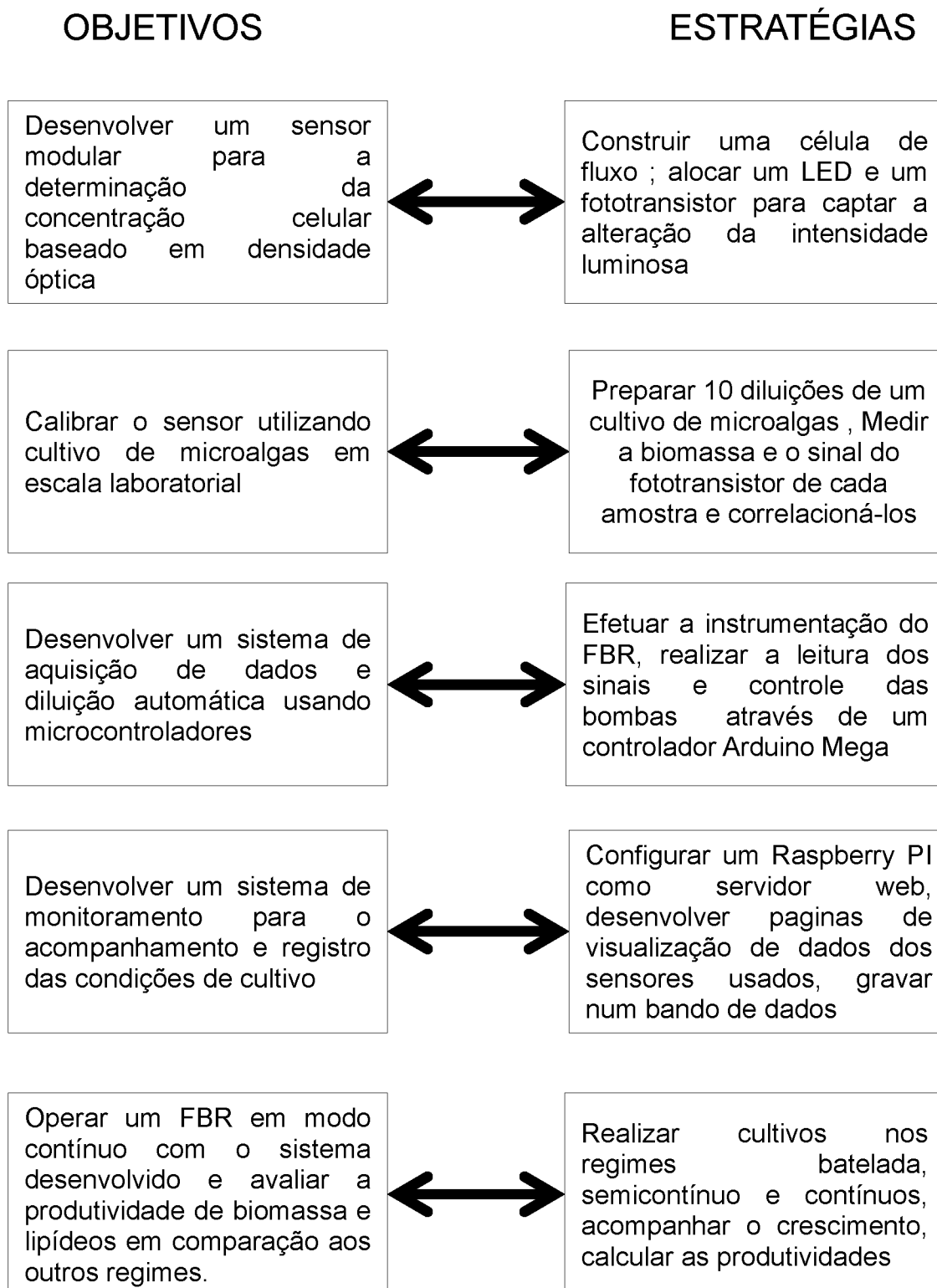
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para atingir o objetivo geral, o trabalho foi dividido nos seguintes objetivos específicos:

- a) Desenvolver um sensor modular para determinação da concentração celular de microalgas baseado em densidade óptica;
- b) Calibrar o sensor utilizando cultivo de microalgas em escala laboratorial;
- c) Desenvolver um sistema de aquisição de dados e diluição automática para fotobiorreatores usando microcontroladores;
- d) Desenvolver um sistema de monitoramento para o acompanhamento das condições de cultivo;
- e) Operar fotobiorreatores em modo contínuo, avaliando a produtividade de biomassa e lipídeos em comparação ao sistema em batelada e semicontínuo.

A Figura 14 relaciona os objetivos específicos estabelecidos com as respectivas estratégias para se alcançar o objetivo proposto.

FIGURA 14– OBJETIVOS E ESTRATÉGIAS



FONTE: O AUTOR (2017).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MICROALGA E MEIO DE CULTIVO

A espécie de microalga utilizada foi a *Acutodesmus obliquus*, disponibilizada pelo NPDEAS e cultivada meio sintético Chu (1942) (Tabela 3). O meio sintético tem por objetivo fornecer todos os nutrientes necessários ao desenvolvimento e crescimento das microalgas, com exceção de carbono.

TABELA 3– COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO MEIO DE CULTIVO SINTÉTICO CHU.

NUTRIENTE	FÓRMULA	QUANTIDADE (g. L ⁻¹)
Nitrato de sódio	NaNO ₃	0,25
Cloreto de cálcio di-hidratado	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,025
Sulfato de magnésio hepta-hidratado	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,075
Fosfato de potássio dibásico	K ₂ HPO ₄	0,075
Fosfato de potássio monobásico	KH ₂ PO ₄	0,175
Cloreto de sódio	NaCl	0,025
Tríplex III/EDTA	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ .2H ₂ O	0,05
Hidróxido de potássio	KOH	0,031
Sulfato ferroso hepta-hidratado	FeSO ₄	0,00498
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	0,01142
Sulfato de zinco hepta-hidratado	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,82 10 ⁻⁶
Cloreto de manganês tetra-hidratado	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,44 10 ⁻⁶
Molibdato de sódio	NaMoO ₄ .2H ₂ O	1,19 10 ⁻⁶
Sulfato de cobre penta-hidratado	CuSO ₄ .5H ₂ O	1,57 10 ⁻⁶
Nitrato de cobalto hexa-hidratado	Co(NO ₃).2.6H ₂ O	0,49 10 ⁻⁶

FONTE: NPDEAS (2017).

4.2 FOTOBIOREATOR E CONDIÇÕES DE CULTIVO

As microalgas foram cultivadas em FBR se secção quadrada, de dimensões de 115x115x170 mm, volume útil de 1.500 mL (Figura 15), sob a temperatura de 20 ± 2 °C e constante iluminação de duas lâmpadas fluorescentes de 40 W (2700 lúmens). A agitação do meio de cultura é realizada pela adição de ar comprimido com vazão 2 L.min⁻¹, sendo também a fonte de CO₂ ao cultivo. A escolha deste FBR

para este experimento esta baseada na necessidade da alocação das sondas de pH e temperatura e das mangueiras para a diluição do FBR.

FIGURA 15– FOTOBIORREATOR USADO NOS EXPERIMENTOS



FONTE: O AUTOR (2017).

4.3 AVALIAÇÃO DO CULTIVO

A avaliação dos cultivos será realizada em função da determinação dos seguintes parâmetros: determinação da densidade celular, análise espectrofotométrica, análise e quantificação de biomassa seca, determinação de pH, análise e determinação da quantidade de lipídeos totais.

4.3.1 Determinação da densidade celular

A densidade celular consiste no número de células por mL presente na cultura e é determinada por meio de contagens em microscópio óptico com aumento de 400 vezes com o auxílio de câmaras de Neubauer e realizados ao longo dos dias de cultivo (LOURENÇO, 2006). As contagens sempre serão realizadas em triplicata. O resultado será representado como a média \pm 2 vezes o desvio padrão. Os resultados serão representados em números de células por mililitros de cultivo (células. mL⁻¹).

4.3.2 Determinação da biomassa seca

A determinação de biomassa seca (quantidade de biomassa por volume de cultura) é realizada através de metodologia gravimétrica sempre em triplicata em

todos os cultivos. Serão utilizados microfiltros de fibra de vidro Macherey-Nagel GF-1, de diâmetro de 47 mm para filtração, utilizando bomba a vácuo. Primeiramente, os microfiltros serão levados à estufa com temperatura de 60 °C até atingirem massa constante para a retirada de sua umidade natural. A massa dos microfiltros secos deverá ser então aferida. Depois disso, três amostras de 5 mL dos cultivos serão retiradas e filtradas separadamente. Os microfiltros com as amostras serão levados à estufa a temperatura de 60 °C até atingirem massa constante. O cálculo do método gravimétrico utilizado para medida da biomassa seca em gramas por litros (g. L⁻¹) foi feito pela equação:

$$B_s = \frac{F_1 - F_2}{V} \quad (6)$$

Onde B_s é a biomassa seca da amostra (g.L⁻¹), F₁ a massa do microfiltro seco (g), F₂ a massa do microfiltro com biomassa seca (g); V o volume de cultivo filtrado (L).

4.3.3 Determinação da absorbância

A determinação da absorbância dos cultivos será realizada em espectrofotômetro da marca Perkin-Elmer através do software Lambda 25 - UV/VIS Spectrometer com cubetas de caminho óptico de 1 cm e comprimento de onda de 517 nm. A água destilada será utilizada como “branco” para zerar a leitura do equipamento. Através da análise de absorbância pode-se determinar a turbidez dos cultivos, indicando maior ou menor presença de células e biomassa de microalgas. Para se evitar distorções nas leituras e interpretações incorretas dos dados, quando a medida de absorbância resultar em valor superior a 0,5. Foram realizadas diluições para atingir a faixa de 0,1 a 0,5. Isso consiste em uma prática comumente realizada para determinação de absorbância quando se realiza estimativa do crescimento celular com microrganismos.

4.3.4 Determinação manual de pH

O pH dos cultivos foram aferidos diariamente com o uso de pHmetro. A determinação do pH das culturas foi realizada através de leitura direta na amostra

em pHmetro digital (Gehaka PG 1800). A importância de monitoramento deste parâmetro é justificada pelo fato de que o crescimento autotrófico de microalgas em cultivos envolve o consumo de CO₂ dissolvido no meio, aumentando o pH do sistema, que em alguns casos, pode atingir níveis tóxicos para muitas espécies influenciando direta ou indiretamente o metabolismo das microalgas.

4.3.5 Determinação de teor de lipídeos totais

Para a quantificação dos lipídeos totais dos cultivos foi realizada a metodologia de extração à frio adaptada por HOUSSEINI *et al.* (2015). Essa metodologia permite a recuperação de todos os materiais apolares presentes na amostra (lipídeos neutros, pigmentos, fosfolipídios). Os ensaios foram realizados em triplicata. Foram pesados 50 mg de amostra de biomassa seca de microalga triturada em tubos *falcon* de polipropileno de 14 mL. Em seguida, adicionou-se 1,2 mL da mistura da solução de clorofórmio : metanol (2:1, v:v). A seguir, as amostras foram submetidas à ultrassom em um sonicador (Shuster Lavadora Ultrassônica, frequência de 40 kHz) por 30 minutos. Após o ultrassom, as amostras foram centrifugadas (Centrífuga Daiki 80-2B) a 4000 rpm por 15 min; o sobrenadante com a fase lipídica foi recuperado com uma pipeta Pasteur e reservado em outro tubo *vial*. Este procedimento é realizado 3 vezes. Após a terceira retirada de material, o *vial* é levado a uma câmara de exaustão de gases, onde os solventes são evaporados. O teor de lipídeos em porcentagem foi determinado pela equação :

$$Lipídeos\ totais(\%) = \frac{(V_2 - V_1)}{BM} \cdot 100\% \quad (7)$$

Onde V_1 é a massa do *vial* vazio (g), V_2 a massa do *vial* com lipídeos (g), BM a biomassa seca utilizada na extração de lipídeos (g).

4.3.6 Produtividade de biomassa

As produtividades dos cultivos em batelada e semicontínuo são calculadas de acordo com a seguinte equação:

$$P = \frac{X - X_0}{t - t_0} \quad (8)$$

Para sistemas de cultivo contínuos, a expressão é dada pela seguinte equação:

$$P_c = X \cdot D \quad (9)$$

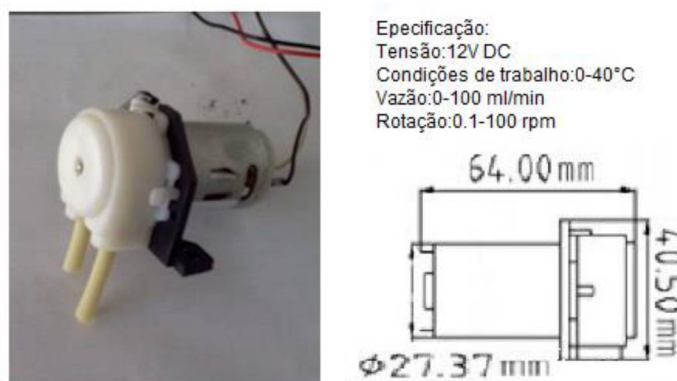
Onde: P_c é produtividade de biomassa em regime contínuo ($\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$), X é a concentração de biomassa (g.L^{-1}) e D a diluição (dia^{-1}) do FBR.

4.4 SISTEMA DE DILUIÇÃO AUTOMÁTICA E AQUISIÇÃO DE DADOS

4.4.1 Bombas peristálticas

São usadas três bombas peristálticas de alimentação por 12 V (volts) (Figura 16), responsáveis por adicionar o meio de cultivo novo e coletar o meio de cultivo com as células. As bombas foram operadas com o auxílio de um circuito integrado (LD 293d), que permite controlar a direção e velocidade de rotação. Os sinais de controle são enviados por saída digitais do microcontrolador. Foi usada uma bomba para a circulação de cultivo na célula de fluxo do sensor de densidade óptica desenvolvido neste trabalho.

FIGURA 16 – BOMBA PERISTÁLTICA



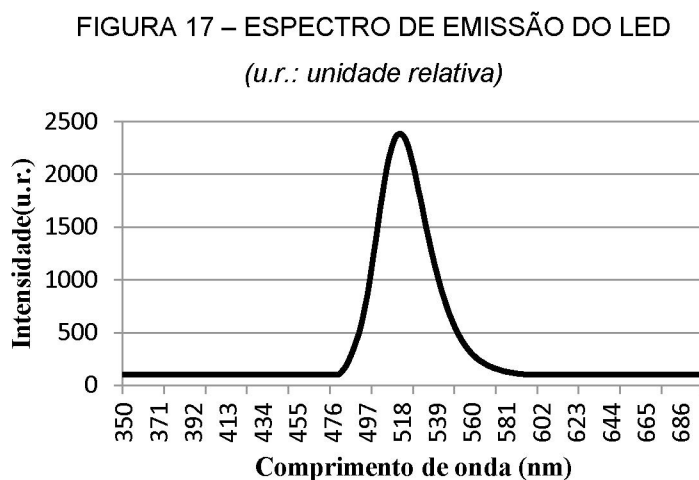
FONTE: O AUTOR (2017).

4.4.2 Sensor de concentração de biomassa

Uma cubeta para espectrofotômetro, de 10 mm de caminho ótico, foi adaptada para atuar como uma célula de fluxo, pela qual o cultivo circula para medir a variação da intensidade luminosa através dele.

Os pigmentos fotossintetizantes como a clorofila, que dá a cor verde característica da maioria dos vegetais, absorve muito bem a luz nas faixas do vermelho e do violeta, refletindo a luz verde. Sabendo que o efeito de espalhamento devido à reflexão da luz não absorvida gera uma atenuação na intensidade incidente de forma semelhante à absorção, é possível definir relação entre variação da quantidade de luz que atravessa uma cubeta e a concentração de biomassa de microalga no cultivo.

O sensor para determinação da densidade ótica consiste em um LED (*Light Emitting Diode*) de alta luminosidade, de 5 mm e espectro de emissão mostrado na Figura 17. É observado um pico em 517 nm, medido com um espectrofotômetro da marca Ocean Optics, modelo USB2000.

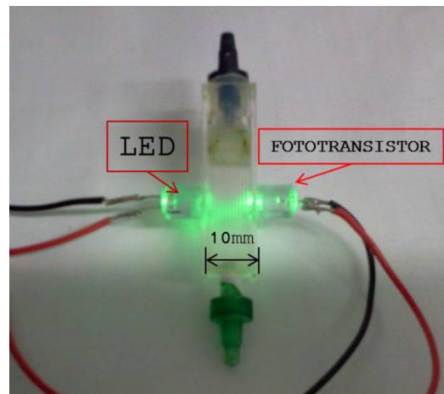


FONTE: O AUTOR (2017).

A luz emitida pelo LED é captada no lado oposto da cubeta por um fototransistor. O fototransistor é um dispositivo que funciona baseado no fenômeno fotoelétrico. Ele pode, ao mesmo tempo, detectar a incidência de luz e fornecer um ganho dentro de um único componente. Em geral, possui apenas dois terminais acessíveis, o coletor e o emissor, sendo a base a região fotossensível exposta à luz incidente. A Figura 18 apresenta a imagem do sensor de densidade ótica construído.

Uma bomba peristáltica realiza a circulação do cultivo através da cubeta, num ciclo fechado, isto é, a amostra retirada do FBR, flui pela cubeta e retorna para o FBR, de forma intermitente. Após sua construção ele foi revestido com material opaco de cor preta com o intuito de diminuir a influência da luminosidade externa.

FIGURA 18 – SENSOR DE DENSIDADE ÓTICA



FONTE: O AUTOR (2017).

A amostragem do sinal no momento da leitura é de 100 leituras por medição. Devido á possibilidade de não homogeneidade da amostra retirada ocasionada pelo fluxo, foi implementado um filtro suavização exponencial simples, que pondera as observações passadas com pesos decrescentes exponencialmente para adequação da leitura atual. Para qualquer período de tempo t , o valor suavizado S_t é calculado com a equação:

$$S_t = \alpha y_{t-1} (1 - \alpha) S_{t-1}, 0 < \alpha \leq 1 \text{ e } t \geq 3 \quad (10)$$

Os subscritos se referem aos períodos de tempo, 1, 2, ..., n e o parâmetro α é chamado de constante de suavização.

4.4.3 Microcontrolador Arduino Mega 2560™

O Arduino Mega 2560™ é uma plataforma baseada no microcontrolador ATmega 2560. Constituído de 54 pinos de entrada e saída dos quais 14 podem ser usados como saída PWM, 16 entradas analógicas, quatro UARTs, um cristal oscilador de 16 MHz, uma conexão USB com base em ICSP. Ele contém tudo o que é necessário para fazer utilização de todos os recursos disponíveis do

microcontrolador, basta conectá-lo a porta USB ou ligá-lo a uma fonte ou bateria para energizar o módulo.

4.4.4 Determinação de pH *in situ* através da aquisição de dados

Para se medir pH, é utilizado um eletrodo de vidro (Figura 19) conectado a um equipamento chamado de pHmetro, capaz de medir o pH. O vidro do bulbo, em contato com os íons de hidrogênio, tem seus íons superficiais substituídos por prótons, que por sua vez, estão em equilíbrio com os prótons em solução em cada lado da parede de vidro. Se o eletrodo é imerso numa solução a ser investigada, formam-se potenciais de membrana. A conexão elétrica é feita pela condutividade do vidro, e a diferença de potencial que se estabelece através do vidro (E_m), em volts é dada pela equação de Nernst:

$$E_M = E_a - \frac{2,303RT}{F} pH_e \quad (11)$$

Onde: $R = 8,315 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ e $F = 96485 \text{ C mol}^{-1}$. R é a constante dos gases, T a temperatura absoluta em Kelvin e F a constante de Faraday. E_a é chamado de potencial de assimetria e é diferente para cada membrada de vidro, variando ainda com o tempo. Em função de E_a se faz necessário calibrar o instrumento toda vez que for utilizá-lo usando uma solução de pH conhecido.

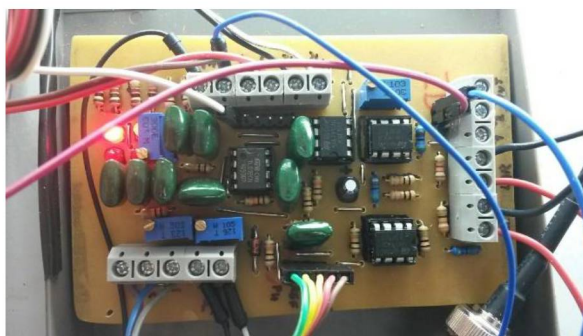
FIGURA 19 – ELETRODO PARA MEDIÇÃO DE PH



FONTE: O AUTOR (2017).

Há dois estágios, um responsável pelo ajuste de ganho e *offset* (ajustados por *trimpot* na calibração) e outro estágio para adequação do sinal para o conversor analógico–digital do microcontrolador. A equação de Nernst foi implementada na programação do microcontrolador.

FIGURA 20 – CIRCUITO PARA MEDIÇÃO DE PH

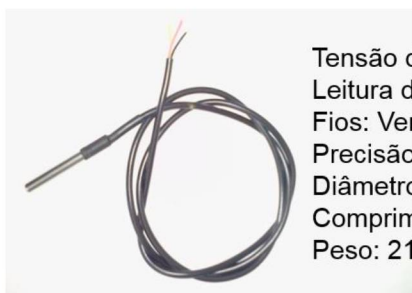


FONTE: O AUTOR (2017).

4.4.5 Determinação da temperatura por aquisição de dados

Para fazer o monitoramento da temperatura, foi escolhido como sensor o DS18B20 (Figura 21), produzido pela Maxim Integrated®, que possui um encapsulamento selado a prova d'água. É um termômetro digital, capaz de fornecer de 9 a 12 bits para medições de temperatura em graus Celsius ($^{\circ}\text{C}$), tem função de alarme não volátil programável com pontos de disparo superior e inferior, podendo operar de -55°C a $+125^{\circ}\text{C}$, com uma precisão de $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Cada sensor possui um código de série exclusivo de 64bits, permitindo que vários sensores DS18B20 possam funcionar na mesma linha, utilizando apenas uma porta de entrada no microcontrolador por meio da interface 1-Wire. O sensor já vem pré-calibrado de fábrica, dispensando a necessidade da construção de um circuito condicionador de sinal.

FIGURA 21– SONDA DE TEMPERATURA



Tensão de alimentação: 3.0 - 5.5VDC
 Leitura de temperatura entre: -55°C a $+125^{\circ}\text{C}$
 Fios: Vermelho(VCC), Branco(DATA) e Preto(GND)
 Precisão: $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$
 Diâmetro: 6mm
 Comprimento do fio: 90cm
 Peso: 21g

FONTE: O AUTOR (2017).

4.4.6 Medição de iluminância

Para a medição da iluminância foi utilizado o sensor TSL2561, capaz de detectar luz visível e infravermelha. Possui resolução de 16 bits, conversor analógico-digital integrado. Cada sensor possui código de serie exclusivo permitindo o funcionamento de vários sensores na mesma linha por meio da interface 1-Wire.

4.4.7 Sistema de supervisão web

Sistemas supervisórios são usados para o monitoramento e operação de plantas industriais através do gerenciamento de variáveis de processos, que podem ser acessadas em tempo real, armazenadas para fins de registro histórico e modificadas de forma a controlar a execução do processo. Esse tipo de sistema é relativamente antigo em seu uso. Porém, a versão digital começou a ser usada no final do século XX, graças à disseminação dos computadores em todas as áreas do conhecimento e da produção (MORAES; CASTRUCCI, 2007). Além dos protocolos industriais, os SCADA (*Supervisory control and data acquisition*) cada vez mais têm de lidar com protocolos de comunicação comuns nos demais sistemas de informação, particularmente os utilizados pela Internet.

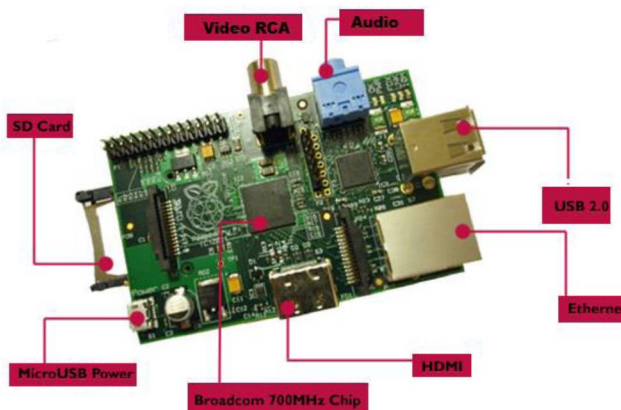
Durante a ultima década pode-se observar o rápido desenvolvimento das redes de computadores e a Internet. Os serviços da Internet propiciaram meios para a disponibilização e acesso a grandes volumes de informações em formatos textuais e multimídia. Estas características se mostraram muito promissoras para desenvolvimento de ambientes para acesso remoto á equipamentos e processos, possibilitando seu monitoramento e controle.

Uma alternativa de baixo custo para implementação do servidor web e de banco de dados , que foi escolhido para o projeto foi o Raspberry PI (Processador Broadcom BCM2835/ CPU de 700MHz e memória integrada de 512 MB) mostrado na Figura 22.

Para conceber o sistema supervisório para FBR, o RPi foi configurado para atuar como servidor *web*. Os seguintes pacotes foram instalados: Apache 2 (servidor *web*); PHP-5 (interpretador de hipertexto) e MySQL (banco de dados). Deste modo, através de páginas *web* hospedadas no RPi é possível monitorar as variáveis do

bioprocesso de forma *online* , podendo ser acessada de qualquer dispositivo que tenha acesso a internet ou intranet do local.

FIGURA 22 – MINICOMPUTADOR SERVIDOR DE DADOS (RASPBERRY PI)



FONTE: Adaptado de REIS (2017).

As páginas do sistema foram desenvolvidas com as seguintes linguagens: HTML (*HyperText Markup Language*) para o documento e estrutura do conteúdo, CSS (*Cascading Style Sheets*) para design e estilo, Javascript e PHP (*Hypertext Preprocessor*) para scripts de funcionamento dinâmico das páginas e acesso ao banco de dados.

4.5 ANALISE DE INCERTEZAS

Os valores de densidade celular, biomassa seca, absorbância e pH e sinal do sensor desenvolvido avaliados neste projeto serão as médias das triplicatas das amostras de cada experimento \pm duas vezes o desvio padrão. Foi considerado duas vezes o desvio padrão já que apresenta 95% de confiabilidade das amostras considerando uma distribuição normal.

4.5.1 Erro de estimação do sensor

O erro de estimação do valor da biomassa pelo sensor construído foi avaliado a partir do erro percentual absoluto médio (MAPE - *mean absolut percentual error*) em relação ao período em que aplicado à diluição no FBR. Este valor indica a

exatidão que o sensor possui em estimar a concentração de biomassa durante o experimento e é calculado a partir da seguinte equação:

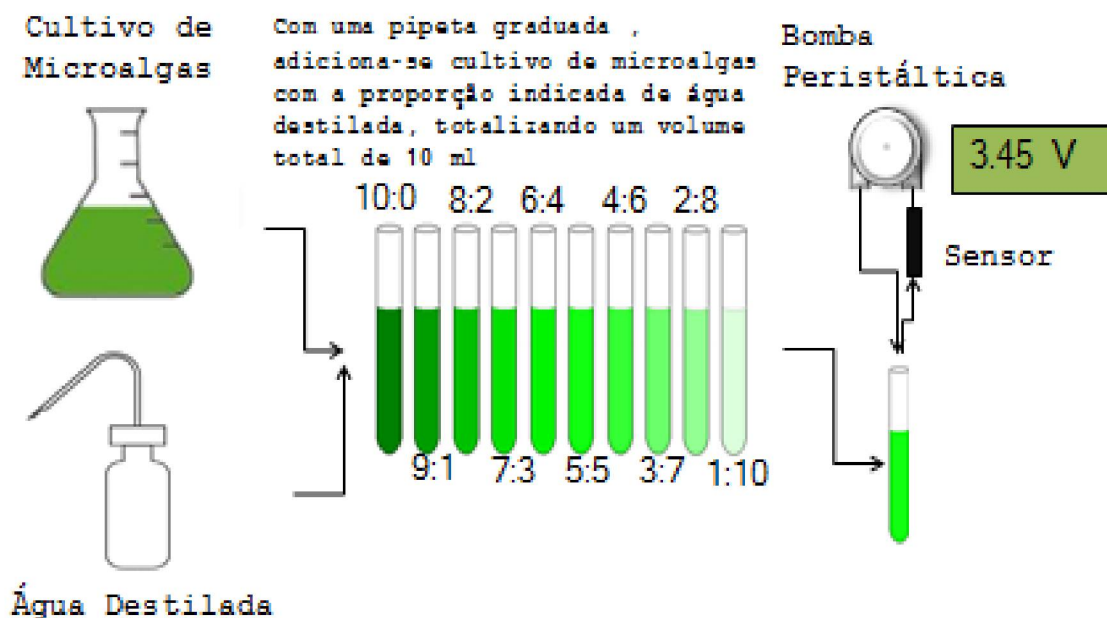
$$MAPE(\%) = \frac{100}{n} \sum \left(\frac{|X_{obs} - X_{est}|}{|X_{obs}|} \right) \quad (12)$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CALIBRAÇÃO DO SENSOR DE CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA

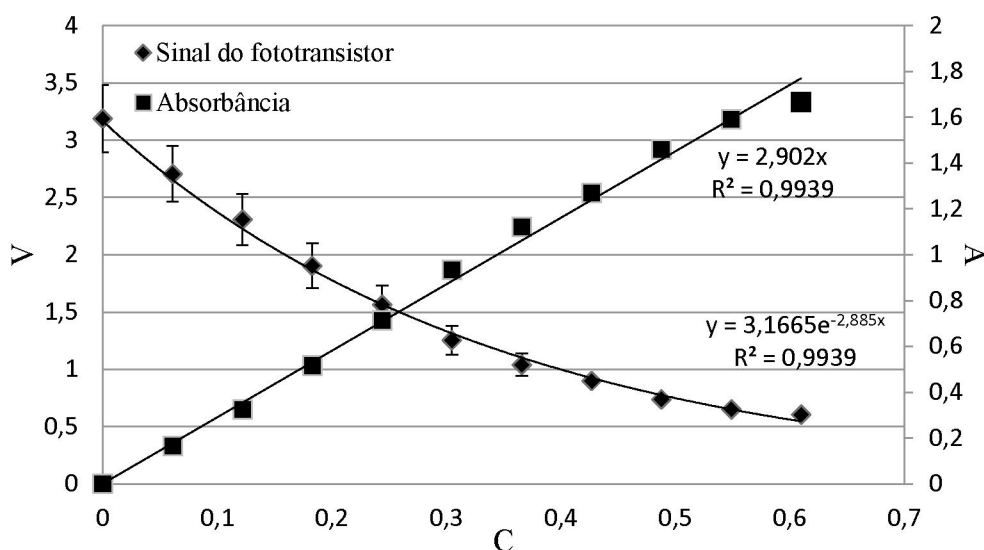
Uma amostra de um cultivo em fase avançada (concentração de biomassa $0,637 \pm 0,04 \text{ g.L}^{-1}$) foi retirada de um dos Erlenmeyers mantidos na sala de cultivo do NPDEAS. Foram preparadas 10 diluições variando proporcionalmente a concentração celular, de 100% de amostra até água pura. Com uma pipeta graduada, adiciona-se cultivo de microalgas com a proporção de água destilada, totalizando um volume total de 10 ml, como mostrada da Figura 23. A Figura 24 mostra o gráfico de calibração. Foi obtida a seguinte correlação: $y = 2,902x$ com $R^2 = 0,9939$. Onde y é a absorbância e x a concentração celular e R^2 o coeficiente de determinação. A atenuação da luminosidade com o aumento da concentração teve um decaimento exponencial. A medida do sinal para a água (usado como referência no cálculo da absorbância) foi de $3,45 \pm 0,6 \text{ V}$.

FIGURA 23 – PROCEDIMENTO DE CALIBRAÇÃO



FONTE: O AUTOR (2017).

FIGURA 24 – CURVA DE CALIBRAÇÃO



FONTE: O AUTOR (2017).

5.2 SISTEMA AUTOMATIZADO DE CULTIVO

O sistema de cultivo automatizado construído é capaz de realizar as diluições no FBR de acordo com as taxas requeridas com regularidade nas adições e retiradas de cultivo além de garantir um modo de acompanhamento *online* e tempo real das variáveis do FBR.

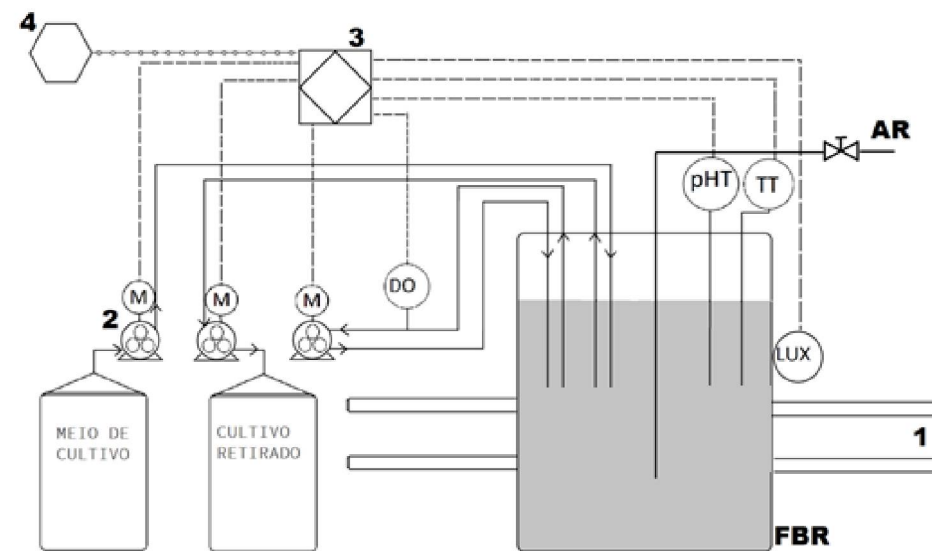
A Figura 24 mostra o diagrama P&ID (*pipe and instrumentation diagram*) do sistema desenvolvido (Figura 25). As sinais dos sensores de concentração, temperatura, iluminância e do pHmetro são recebidos pelo microcontrolador por portas analógicas (concentração e pH) e digitais (temperatura e iluminância). Estes valores são enviados para o RPi, através da comunicação serial (*baud rate* de 9600bps), pela conexão USB entre os dois dispositivos. Um *script* em linguagem Python foi implementado para a leitura da porta serial, a gravação das medidas num banco de dados e num arquivo XML, usado para dispor os dados para a página principal de supervisão.

O sistema de supervisão (Figura 26) é constituído por três páginas: uma tela principal, que mostra os valores das variáveis monitoradas e possui controles das bombas e configurações do experimento, uma página de inserção de dados obtidos das análises efetuadas na avaliação do crescimento como biomassa seca, número

de células, e densidade ótica. O sistema também possui uma página de visualização de gráficos, que mostram a evolução temporal das variáveis monitoradas durante o experimento.

FIGURA 25– DIAGRAMA DE INSTRUMENTAÇÃO.

(1) Lâmpadas fluorescentes, (2) Bombas peristálticas, (3) Microcontrolador (ATmega) e (4) Servidor (Raspberry PI).



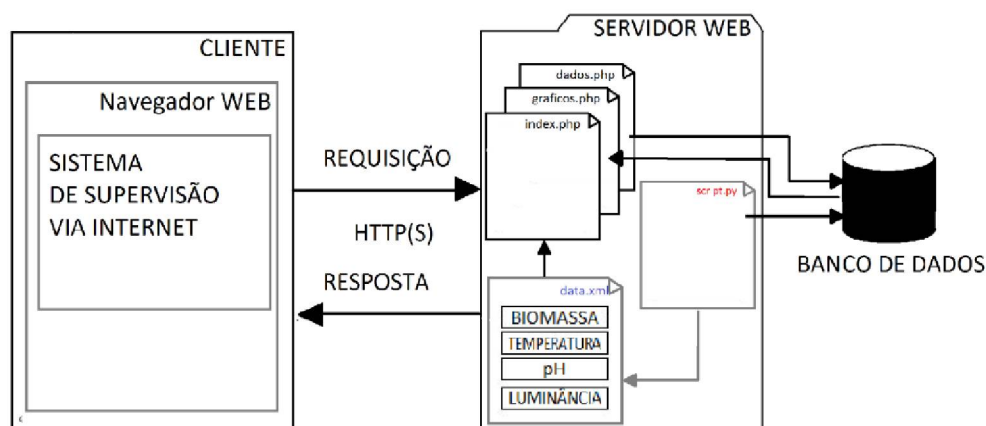
FONTE: O AUTOR (2017).

FIGURA 26– SISTEMA AUTOMATIZADO PARA FOTOBIOREACTORES



FONTE: O AUTOR (2017).

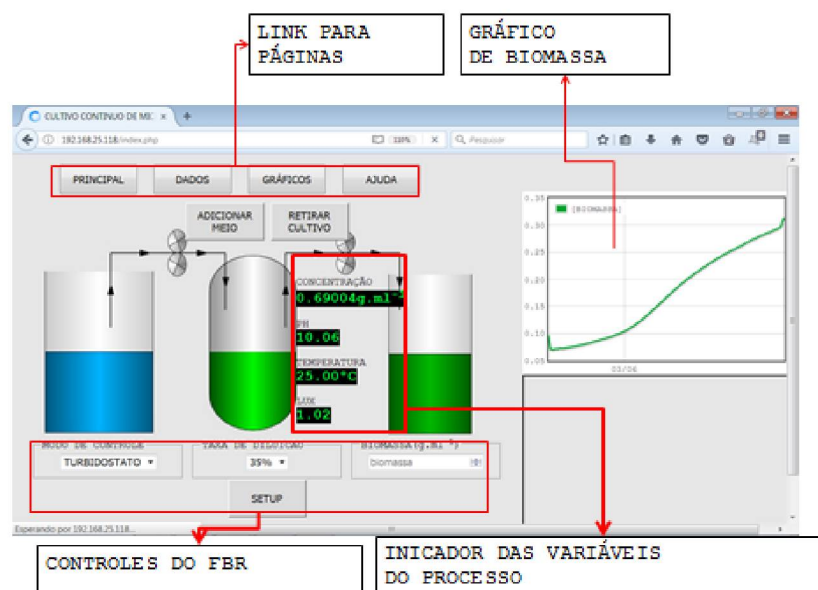
FIGURA 27– DIAGRAMA DE FLUXO DE INFORMAÇÕES



FONTE: O AUTOR (2017).

A Figura 27 mostra a tela principal (interface do usuário) do supervisor web. Nesta tela principal é mostrado o diagrama esquemático do processo de cultivo, é possível escolher o modo de operação, entre turbidostato ou quimiostato, e ajustar os valores de referência de biomassa de corte. Tais configurações são enviadas para o microcontrolador pela comunicação serial, onde é configurado o experimento e calculada as vazões das bombas de acordo com a diluição escolhida.

FIGURA 28– PÁGINA DE SUPERVISÃO E CONTROLE



FONTE: O AUTOR (2017).

A Figura 28 mostra a página de inserção dos dados das análises quantitativas feitas no laboratório: absorbância, número de células e biomassa seca. São calculadas as médias a partir dos valores inseridos. O botão “Gravar” realiza a gravação das informações no banco de dados enquanto o botão “Download” inicia o download de um arquivo de planilha contendo todos os dados armazenados no banco de dados, incluindo os valores provenientes dos sensores.

FIGURA 29– PÁGINA DE INSERÇÃO DE DADOS DAS ANÁLISES LABORATORIAIS

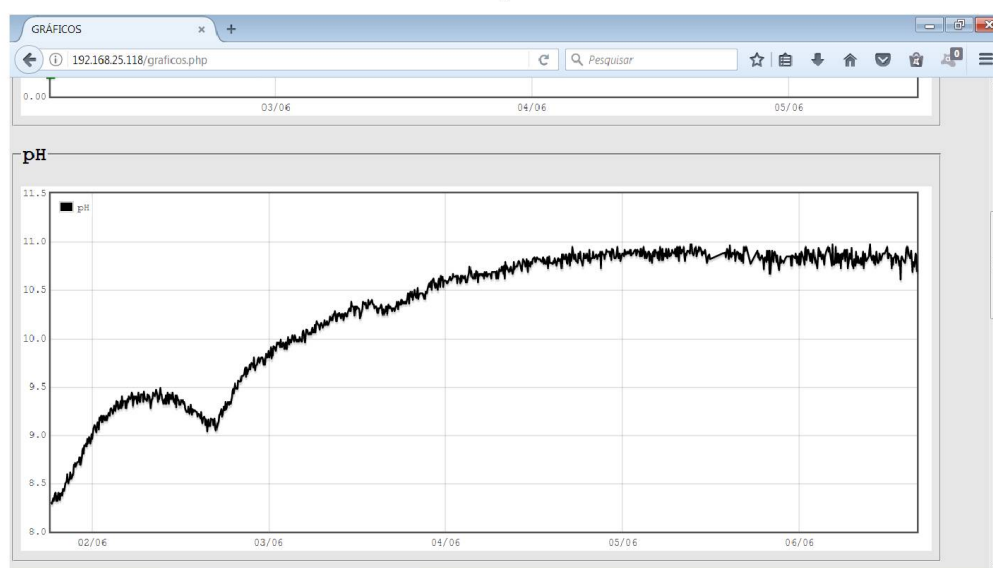
The screenshot shows a web browser window with a form titled "DADOS CULTIVO CENÁRIO". The form contains three columns of data entry fields. Above the form, three labels with arrows point to the column headers: "ABSORBÂNCIA" points to the "D.O. 540nm" column, "NÚMERO DE CÉLULAS" points to the "Num. de Células (x10⁴)" column, and "BIOMASSA SECA" points to the "Biomassa Seca (g/L)" column. Below the data entry fields, there are two buttons: "GRAVAR" and "DOWNLOAD". A label "BOTÃO PARA GRAVAÇÃO NO BANCO DE DADOS" has an arrow pointing to the "GRAVAR" button. Another label "BOTÃO PARA DOWNLOAD DOS DADOS EM PLANILHA" has an arrow pointing to the "DOWNLOAD" button. The data entry fields are as follows:

D.O. 540nm	Num. de Células (x10 ⁴)	Biomassa Seca (g/L)
1,2874	862	0,398
1,3262	743	0,391
1,3281	672	0,4509
Média: 1,3139	Média: 759	Média: 0,4133
		Desvio padrão: 0,026740

FONTE: O AUTOR (2017).

A Figura 29 mostra a evolução do pH cultivo na fase de crescimento sem diluição. Iniciou com um valor inicial aproximado de 8,3. Devido à elevada solubilidades do gás carbônico em soluções aquosas, várias condições de equilíbrios são estabelecidas. A elevação do pH é um forte indicador do alto consumo de carbono inorgânico devido ao crescimento celular (LEE *et al.*, 2006).

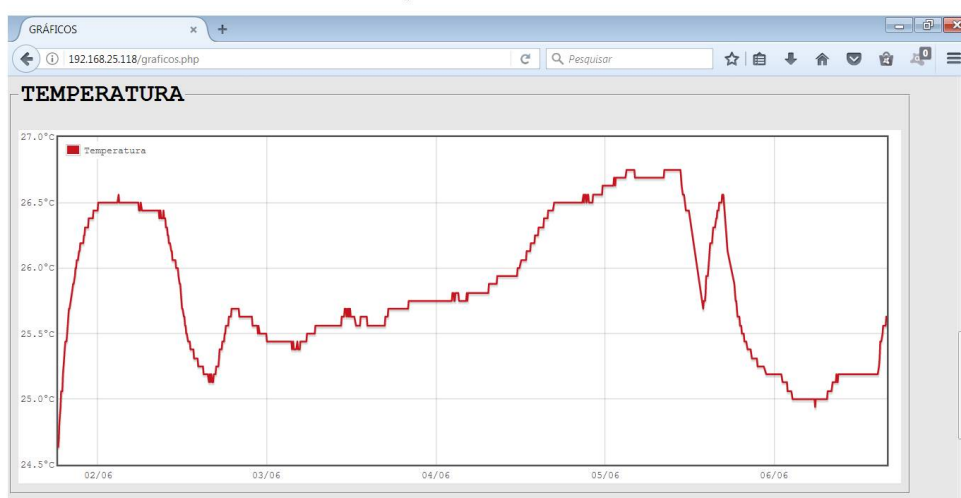
FIGURA 30– VISUALIZAÇÃO DO GRÁFICO DE PH



FONTE: O AUTOR (2017).

A Figura 30 mostra a evolução da temperatura durante o experimento. São observadas pequenas variações na temperatura que variou 24°C a 26,5°C aproximadamente. Considerando que o ar condicionado mantém a temperatura estável na sala de cultivo, ainda alguns fatores que podem influenciar a temperatura no interior do FBR, como a temperatura do ar proveniente do soprador e o calor fornecido pelas lâmpadas.

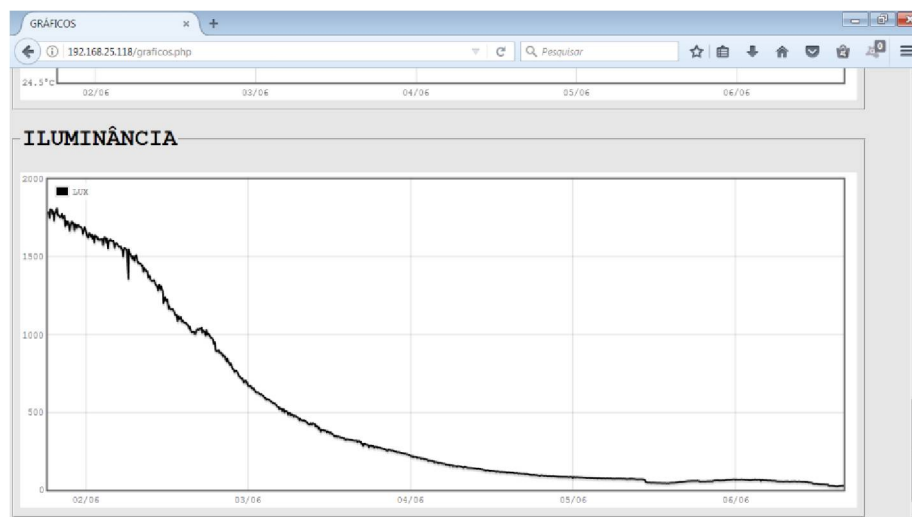
FIGURA 31 – VISUALIZAÇÃO DO GRÁFICO DE TEMPERATURA



FONTE: O AUTOR (2017).

A Figura 31 mostra a evolução da iluminância através do FBR. O decrescimento exponencial da intensidade observado indica o aumento da densidade celular, que por sua vez acarreta o autossombreamento. A luminosidade disponível para o cultivo é um fator fundamental que influencia diretamente na taxa de crescimento.

FIGURA 32– VISUALIZAÇÃO DO GRÁFICO DA ILUMINÂNCIA ATRAVÉZ DO FBR



FONTE: O AUTOR (2017).

5.3 AVALIAÇÃO DA PRODUTIVIDADE DOS REGIMES DE CULTIVO

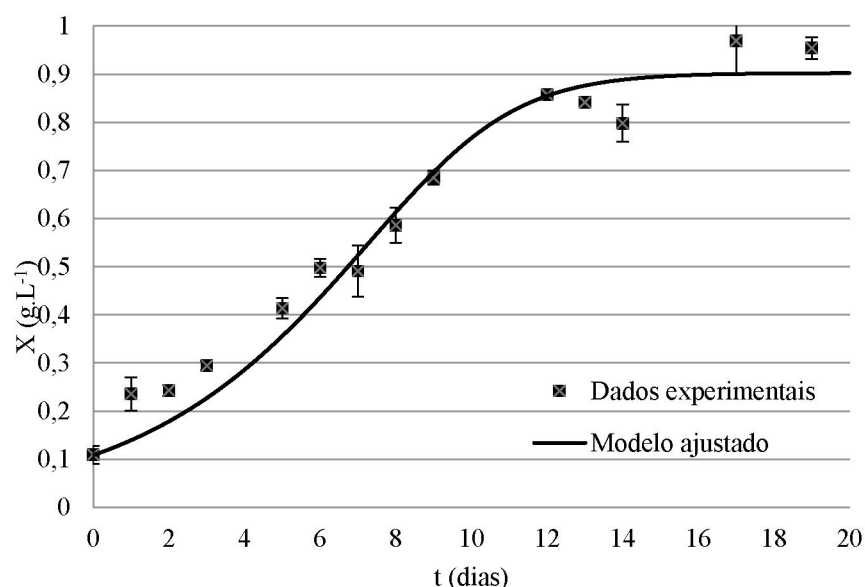
5.3.1 Cultivos em regime batelada e semicontínuo

Foram realizados cultivos nos regimes batelada e semicontínuo conduzido de forma manual. O modelo de crescimento (Equações 1, 2 e 3) foi ajustado aos dados experimentais de biomassa do cultivo em batelada, pela minimização do somatório do erro quadrático. As equações diferenciais foram resolvidas com o método de Euler e os parâmetros foram estimados com o auxílio da ferramenta Solver (Microsoft Excel). Os parâmetros estimados foram a taxa de crescimento máxima ($\mu_{\max} = 0,48 \text{ dia}^{-1}$), o coeficiente de saturação ($K_s = 0,2148$) e o fator de conversão ($Y_{x/s} = 0,3146 \text{ dia}^{-1}$).

A concentração de biomassa máxima alcançada no cultivo em batelada (Figura 32) foi de $0,987 \text{ g.L}^{-1}$. De acordo com o modelo, a concentração de biomassa crescerá até certo limite, alcançando um período de desaceleração e atingindo uma

fase estacionária, ocasionado pela diminuição de disponibilidade de nutrientes. Entretanto, o regime semicontínuo não apresenta esse perfil, desde que são realizadas diluições periódicas, mantendo o cultivo em condições para manter um crescimento exponencial por um longo período de tempo (SANTOS, 2016). A Tabela 5 mostra o cálculo da produtividade média para o período de crescimento.

FIGURA 33– CULTIVO REGIME BATELADA E AJUSTE DO MODELO DE CRESCIMENTO



FONTE: O AUTOR (2017).

TABELA 4– CÁLCULO DAS PRODUTIVIDADES PARA O REGIME BATELADA

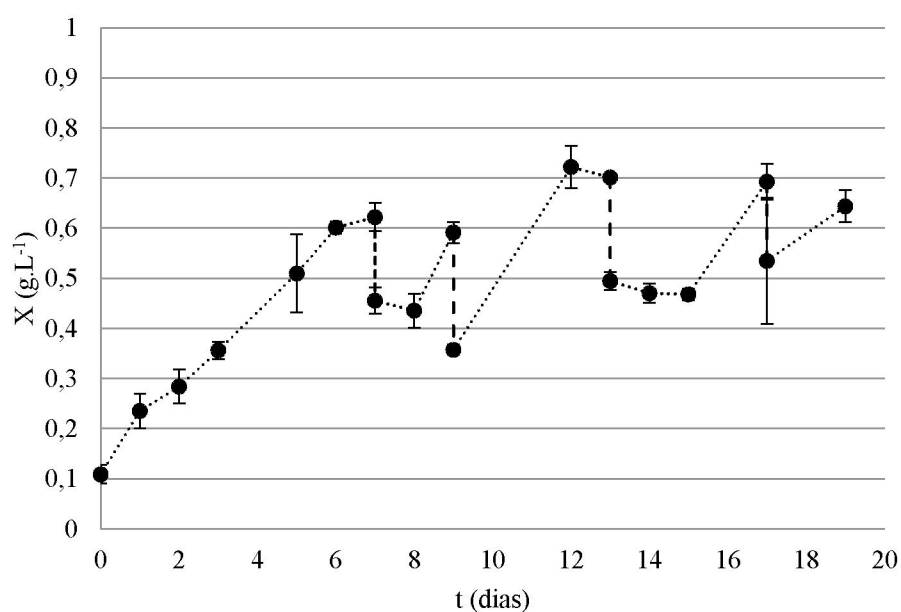
Intervalo de tempo (dias)	$X_2 - X_1$ (g.L ⁻¹)	$\Delta t(t_2 - t_1)$	Produtividade (g.L ⁻¹ .dia ⁻¹)
0-1	0,1266	1	0,1266
1-2	0,007	1	0,007
2-3	0,0516	1	0,051
3-5	0,1193	2	0,0596
5-6	0,084	1	0,0840
6-8	0,0886	2	0,0443
8-9	0,0993	1	0,0993
9-12	0,172	3	0,0573
12-14	-0,0593	2	-0,0296
14-17	0,1713	3	0,0571
17-19	-0,0153	2	-0,0076
Produtividade média (mg.L⁻¹.dia⁻¹)			49,97

FONTE: O AUTOR, 2017.

O cultivo semicontínuo cresceu em regime batelada até 7º dia. As diluições foram de 40%, realizadas no momento que o cultivo alcançava 0,7 g.L⁻¹ e o cultivo permaneceu nesse regime até 19º dia (Figura 33). As renovações do meio de cultura criam um ambiente propício para as altas produtividades de biomassa, já que a adição de nutrientes favorece o crescimento celular, enquanto a remoção de parte da cultura garante um cultivo com pequenas concentrações de metabólitos e evita o autossombreamento. Foi observada uma fase de adaptação logo após as diluições. A Tabela 6 mostra o cálculo da produtividade média para o período de cultivo.

FIGURA 34 – CULTIVO EM REGIME SEMICONTÍNUO:

(1,2,3,4 – Diluições realizadas)



FONTE: O AUTOR (2017).

TABELA 5– CÁLCULO DA PRODUTIVIDADE MÉDIA PARA O REGIME SEMICONTÍNUO

Intervalo de tempo (dias)	$X_2 - X_1$	$\Delta t(t_2 - t_1)$	Produtividade ($\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$)
0-1	0,1266	1	0,1266
1-2	0,0486	1	0,0486
2-3	0,072	1	0,072
3-5	0,1537	2	0,0768
5-6	0,0916	1	0,0916
6-7	0,0206	1	0,0206
7-8	-0,02	1	-0,02*
8-9	0,156	1	0,1560
9-12	0,3646	3	0,1215
12-13	-0,0207	1	-0,0206*
13-14	-0,0247	1	-0,0246*
14-15	-0,002	1	-0,002*
15-17	0,2246	2	0,1123
17-19	0,1092	2	0,0546
Produtividade média ($\text{mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$)			58,11

FONTE: O AUTOR, 2017.

5.3.2 Cultivo em regime contínuo

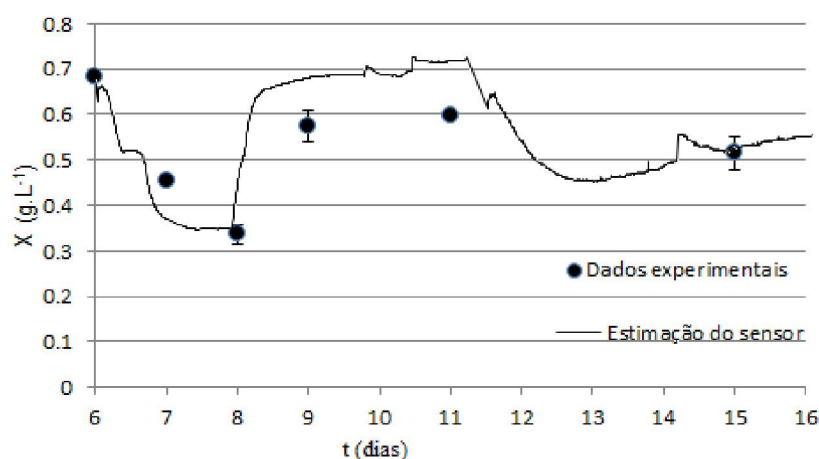
Um cultivo foi iniciado e mantido em regime de crescimento convencional (sem diluição) por 6 dias alcançando o número de células médio de 608 ± 28.10^4 e concentração de biomassa de $0,686 \pm 0,008 \text{ g.L}^{-1}$. A partir do 6º dia, iniciou-se a diluição do FBR com o sistema de diluição desenvolvido. Foi aplicado ao FBR inicialmente a taxa de $0,05 \text{ dia}^{-1}$. Este valor inicial de diluição foi usado para evitar grandes perdas de biomassa num primeiro momento, já observadas em experimentos preliminares.

A taxa foi alterada no 11º dia para $0,2 \text{ dia}^{-1}$. Este valor é baseado nos cálculos das taxas de crescimento em batelada e semicontínuo realizados anteriormente. O quimiostato mantém a disposição de nutrientes para manutenção das células. Com a alteração da taxa de diluição é possível modificar a taxa de crescimento. Determinada as vazões das bombas, foram calculadas as taxas de alimentação de meio de cultivo e retirada da biomassa de acordo com as taxas de diluição estipuladas. O sistema de diluição funcionou corretamente, os volumes das alíquotas coletadas através das bombas permaneceram durante todo o experimento, conferindo assim regularidade na diluição do FBR. Dois reservatórios foram usados,

um para armazenar o meio de cultivo fresco á ser adicionado no reator enquanto o outro é usado na coleta.

A Figura 34 mostra a evolução da concentração de biomassa no regime contínuo e o gráfico da biomassa estimada pelo sensor desenvolvido. A taxa de amostragem média foi de 5 minutos. Nos dois primeiros dias, foi observada uma queda brusca na concentração de biomassa. Pode se atribuir este fenômeno à mudança de regime de cultivo, qual ocasionou uma precipitação repentina, por parte de população de celular em fase avançada. Por ser único meio de agitação do FBR, a vazão do ar injetado foi aumentada para o valor máximo permitido pela tubulação de ar, com o intuito de homogeneizar o cultivo afim de que a leitura do sensor estivesse coerente com a real concentração no interior do FBR. A partir deste momento foi observado incremento significativo na concentração de biomassa e foi observada esta mudança instantaneamente a partir a da leitura do sensor, demonstrando que ele é apto a perceber mudanças repentinas. O erro percentual médio da estimacão de biomassa pelo sensor durante o período de diluição foi de 8,46% (Tabela 6).

FIGURA 35 – CULTIVO EM REGIME CONTÍNUO E ESTIMAÇÃO DO SENSOR



FONTE: O AUTOR (2017).

TABELA 6– CÁLCULO DO MAPE.

Biomassa (analítica) $X_{obs}(g.L^{-1})$	Biomassa (estimada) $X_{est}(g.L^{-1})$	Erro percentual (%)
0.686	0.684	0.292
0.532	0.455	16.816
0.364	0.337	8.104
0.651	0.578	12.653
0.638	0.598	6.680
0.483	0.515	6.206
MAPE (%)		8.46

FONTE: O AUTOR (2017).

O cultivo em regime contínuo exige condições constantes para que a taxa de crescimento não varie durante o processo, caracterizando assim o estado estacionário. Porém algumas variáveis, como o pH por exemplo, variaram ao longo do crescimento e portanto a taxa de crescimento variou enquanto a taxa de diluição permaneceu constante, ocorrendo então a pequena variações de biomassa no interior do reator. A manipulação do cultivo pode causar contaminações por bactérias outros microrganismos, além disso, é muito difícil controlar perfeitamente os parâmetros, como intensidade da luz, temperatura e agitação do meio de cultura, acarretando produtividades menores do que a esperada.

A Tabela 7 mostra a produtividade média para o período inicial de cultivo de 6 dias em crescimento convencional (sem diluição) e para os períodos onde foi observado que a biomassa alcançou uma concentração aproximadamente constante a partir da leitura do sensor. A produtividade nestes períodos foi calculada com a Equação (2) ($P=X.D$). A produção de biomassa de microalgas em regime contínuo apresentou uma produtividade 70,6 % superior ao processo tradicional em batelada e 28,2 % ao processo semicontínuo para este FBR e as condições especificadas.

TABELA 7– PRODUTIVIDADE DO CULTIVO EM REGIME CONTÍNUO

(*) crescimento sem diluição

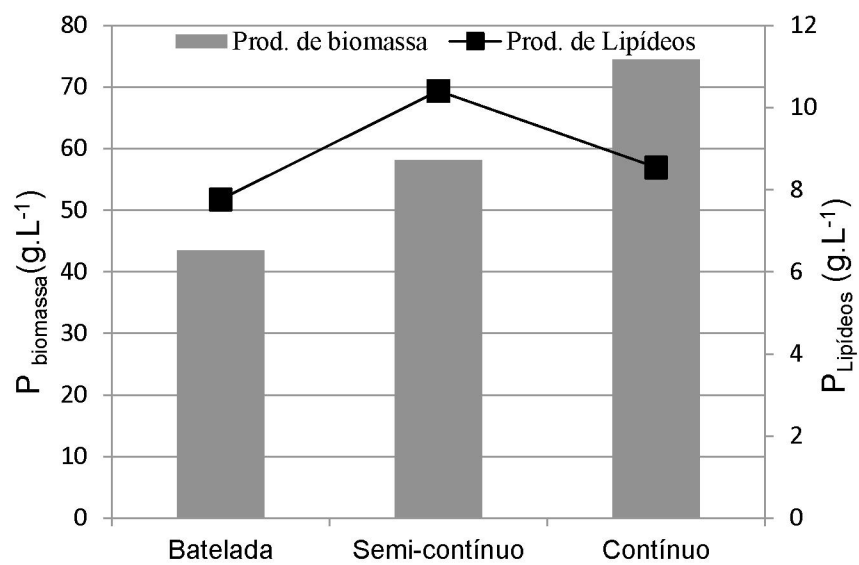
Intervalo de tempo (dias)	$X(g.L^{-1})$	$D(dia^{-1})$	Produtividade ($g.L^{-1}.dia^{-1}$)
0-6*	-*	0	0,09116
9-13	0,5864	0,05	0,02932
13-15	0,5153	0,2	0,10306
Produtividade média ($mg. L^{-1}.dia^{-1}$)			74,6

FONTE::O AUTOR (2017).

5.3.3 Teor de lipídeos nas microalgas dos regimes avaliados

A Figura 35 mostra a comparação das produtividades de biomassa e lipídeos observados nos experimentos deste trabalho. Para o regime batelada foi quantificado o teor de lipídeos (17,88%) no último de dia de cultivo, já na fase estacionaria, caracterizada pela falta de nutrientes consumidos durante o crescimento. Devido à limitação de nitrogênio, principal nutriente que participa da multiplicação celular, o metabolismo das microalgas se altera e começa a acumular energia na forma de lipídeos. Para o regime semicontínuo, foi feita a extração das alíquotas retiradas no momento da diluição, deste modo foi obtido a média de 17,91%. Neste modo de regime, a biomassa cresce até certo ponto até o momento da diluição, neste período também há um pequeno acúmulo de lipídeos, pois parte das células estão em idade avançada. No regime contínuo a amostra usada para a extração foi no período onde o FBR estava operando com a taxa de diluição de $0,2 \text{ dia}^{-1}$, e o teor de lipídeos obtido foi de 11,47%. A diluição constante do reator implica que não haverá limitação por nutrientes, favorecendo assim a multiplicação de células ao invés da produção de lipídeos. Além disso, já foi observado que mesmo aumentando gradualmente a limitação do nitrogênio no regime contínuo, foi descoberto que o amido atua como o armazenamento primário na espécie *Acutodesmus obliquus*, sendo os lipídeos apenas acumulados quando a taxa de síntese de amido é limitada (REMMERS *et al.*, 2017). Pode ser considerado como estratégia adicional é o cultivo em vários estágios isto é, o uso do cultivo contínuo numa primeira etapa, fornecendo alta produtividade de biomassa para uma fase de acúmulo de material lipídico, podendo ser um cultivo heterotrófico, por exemplo, onde há a adição de carbono inorgânico.

FIGURA 36 – PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA E LIPÍDEOS DOS REGIMES DE CULTIVO AVALIADOS



FONTE: O AUTOR (2017).

6 CONCLUSÕES

A seguir serão apresentadas as principais conclusões, itemizadas de acordo com os objetivos específicos anteriormente definidos:

a e b - Neste trabalho foi construído um sensor modular de densidade ótica aplicando conceitos de instrumentação ótica para determinação de turbidez. A partir de sua calibração ele é capaz de estimar a concentração de biomassa num FBR, para concentrações menores que $1 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. As equações obtidas nas curvas de calibração foram implementadas no código do controlador e, durante o experimento apresentou um erro percentual absoluto médio de 8,45% em relação aos valores obtidos nas análises gravimétricas. O sensor desenvolvido é um método rápido e automático para a determinação da concentração da biomassa, podendo ser adaptado á qualquer tipo de FBR e usado com qualquer espécie de microalga, desde que realizada sua calibração.

c – O sistema de diluição automática é ferramenta importante para o cultivo em regime contínuo e demonstrou ter potencial para maximizar a produtividade de biomassa, desde que é possível ajustar a diluição a fim de manter a densidade populacional ótima. O sistema de diluição mostrou uma operação estável, com os volumes de retirada e adição permaneceram constante ao longo do experimento. O desenvolvimento de um sistema automatizado de aquisição de dados para FBR permitiu o registro de informações como temperatura, umidade, pH e luminosidade, fatores que influenciam diretamente a taxa de crescimento. A medição de variáveis em tempo real possibilita o cálculo de produtividade, estimação de taxas de crescimento e conversão, modelos de crescimento, entre outros recursos disponíveis pelas ferramentas computacionais.

d – Um sistema de supervisão e controle via Internet foi desenvolvido para monitorar o processo de cultivo. Foi utilizado linguagens abertas e de ampla flexibilidade de implementação. Dispor as informações relevantes do cultivo de forma rápida e fácil podendo ser acessado remotamente traz versatilidade ao usuário (alunos, pesquisadores, entusiastas e etc.) desde que as tecnologias de acesso á rede são bastante difundidas e vem se tornando a cada dia mais acessíveis. A integração entre os microcontroladores utilizados nesse trabalho demonstrou uma confiabilidade na coleta, transmissão e processamento dos dados, e

possui potencialidade de monitorar diversos FBR e pode ser adaptado a outros processos relacionados com a linha produtiva de microalgas, como a floculação por exemplo. A principal vantagem em trabalhar com plataformas de prototipagem aberta não está apenas no custo, mas na rapidez e capacidade de desenvolvimento.

e - A operação do FBR em regime contínuo demonstrou algumas exigências adicionais em frente aos outros modos. O sistema automatizado de cultivo desenvolvido atendeu as necessidades analíticas e operacionais para FBR em regime contínuo, isto é a medição em tempo real necessária para monitorar as condições do cultivo e também um sistema de diluição automático. Operar fotobiorreatores em modo contínuo aumentou em 74,5% a produtividade de biomassa em comparação ao sistema em batelada e 28,2% em relação ao processo semicontínuo.

7 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Este trabalho teve como principal objetivo desenvolver um sistema automatizado para operar um FBR em regime contínuo em escala laboratorial e monitorar o crescimento de biomassa de microalgas com o registro automático de algumas variáveis importantes na descrição da dinâmica do cultivo. Muitos desafios foram encontrados, já que a abordagem desta área de atuação foi precursora no NPDEAS. A partir das ferramentas desenvolvidas até este momento, é possível indicar as seguintes propostas de trabalhos futuros:

- Aperfeiçoar a construção do sistema como um todo, de forma compacta e robusta, prezando sempre pela facilidade de operação e montagem nos FBR;
- A aplicação dos controladores nos FBR externos;
- Utilização dos dados adquiridos pelo sistema para a modelagem matemática dos cultivos e identificação do sistema FBR, para fins de aplicação de controle.
- Caracterizar a biomassa em diferentes taxas de diluição em relação sua produtividade de lipídeos e analisar o perfil de ácidos graxos no óleo.

REFERÊNCIAS

AHMAD, A.L.; YASIN, N.H. MAT; DEREK, C.J.C.; LIM, J.K., Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 2011.

AKSU, Z.; Biosorption of heavy metals by microalgae in batch and continuous systems. *Wastewater Treat with Algae SE—3*. Springer Berlin Heidelberg, 1998.

BAQUERISSE, D.; NOUALS, S.; ISAMBERT, A.; DOS SANTOS, P.F.; DURAND, G. Modelling of a continuous pilot photobioreactor for microalgae production. **Journal of biotechnology**, 1999.

BECERRA-CELIS, G.; TEBBANI, S.; JOANNIS-CASSAN, C.; ISAMBERT, A.; SIGUERDIDJANE, H. Control strategy for continuous microalgae cultivation process in a photobioreactor, **Control Applications**, IEEE International Conference, 2008.

BENEMANN, J. R. CO₂ Mitigation with microalgae systems. **Energy Conversion and Management**, v.38, p. S475-S479, 1997.

BENTLEY, C.D.; CARROLL, P.M.; WATANABE, W.O. Intensive rotifer production in a pilotscale continuous culture recirculating system using nonviable microalgae and an ammonia neutralizer. **Jornal of World Aquaculture Society**, 2008.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae — A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 2010.

BRETHAUER, S.; WYMAN, C.E.; Review: continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, 2010.

BREWER, P.G.; GOLDMAN, J.C.; Alkalinity changes generated by phytoplankton. *Limnol Oceanography*, 1976.

BRIASSOULIS, D.; PANAGAKIS, P.; CHIONIDIS, M.; TZENOS D., LALOS A, TSINOS, C; *ET AL* An experimental helical–tubular photobioreactor for continuous production of *Nannochloropsis* sp., **Bioresource Technology**, 2010.

BRONESKE, J.; FRANKE, H.;, HIELSCHER, .; HINDERBERG, T.; KRUGER, K; Microorganisms removal method e.g. for removing micro alga films from bioreactors, involves applying ultrasonic power over outside surfaces of containers or reactors by means of Sonotrode, Patent DE 102005025118 A1, 2007.

BUEHNER, M.; YOUNG, P.; WILLSON, B.; RAUSEN, D.; SCHOONOVER, R.; BABBITT, G.; *et al.* Microalgae growth modeling and control for a vertical flat panel photobioreactor. **American Control Conference**. St. Louis, MO; 2009. p. 2301–6.

CAMACHO, F.; GRIMA, E.M.; MARTINEZ, M.E.; SÁNCHEZ, S.; GARCIA F. Continuous culture of the marine microalga *Tetraselmis* sp .—productivity analysis. **Aquaculture**, 90:75–84, 1990.

CARLSSON, A.S.; Micro- and macro-algae: utility for industrial applications: outputs from the EPOBIO project. CPL Press, p. 82.,2007.

CARVALHO ,A.P.; MEIRELES, L.A.; MALCATA, F.X;. Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. **Biotechnology Progress** ,2006.

CARVALHO, A.P; MALCATA, F.X.; Optimization of omega-3 fatty acid production by microalgae: crossover effects of CO₂ and light intensity under batch and continuous cultivation modes. **Marine Biotechnology** ,2005.

CASTELLANOS, C.S. Batch and continuous studies of *Chlorella vulgaris* in photobioreactors. The University of Western Ontario, p. 80, 2013.

ČERVENÝ, J.; ŠETLÍK, I.; TRTÍLEK, M.; NEDBAL L. Photobioreactor for cultivation and real-time, in situ measurement of O₂ and CO₂ exchange rates, growth dynamics, and of chlorophyll fluorescence emission of photoautotrophic microorganisms. **Engineering Life Sciences**. 2009; 9(3):247–53.

CHEN, P.; MIN, M.; CHEN, Y.; WANG, L.; LI, Y.; CHEN, Q.; WANG, C.; WAN, Y.; WANG, X.; CHENG, Y.; DENG, S.; HENNESSY, K.; LIN, X.; LIU, Y.; WANG, Y.; MARTINEZ, B.; RUAN, R. Review of the biological and engineering aspects of algae to fuels approach. **International Journal of Agricultural e Biological Engineering**, v. 2, n. 4, p. 1-30, 2009.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 249-306, 2007.

CÓRDOBA-MATSON ,M.V.; GUTIÉRREZ, J.; PORTA-GÁNDARA, M.Á. Evaluation of *Isochrysis galbana* (clone T-ISO) cell numbers by digital image analysis of color intensity. **Journal Applied Phycology**, 2009.

CUARESMA, M.; JANSSEN, M.; VAN DEN END E.J.; VÍLCHEZ C, WIJFFELS RH. Luminostat operation: A tool to maximize microalgae photosynthetic efficiency in photobioreactors during the daily light cycle. **Bioresource Technology**, 2011.

CUARESMA, M.; JANSSEN, M.; VÍLCHEZ, C.; WIJFFELS, R.H. Productivity of *Chlorella sorokiniana* in a short light-path (SLP) panel photobioreactor under high irradiance. **Biotechnology and Bioengineering**, 2009.

DEL CAMPO , J.A.; RODRÍGUEZ H.; MORENO J.; RIVAS, J.; GUERRERO M.G. Lutein production by *Muriellopsis* sp. in an outdoor tubular photobioreactor. **Journal of Biotechnology**, 2001.

DEL RÍO ,E; ACIÉN F.G.; GARCÍA-MALEA M.C.; RIVAS J.; GRIMA E.M.; GUERRERO M.G. Efficient one-step production of astaxanthin by the microalga *Haematococcus pluvialis* in continuous culture. **Biotechnology Bioengineering**, 2005.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S.M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 6, p. 1959 -1967, 2006.

DOUCHA, J.; STRAKA, F.; LÍVANSKÝ ,K.; Utilization of flue gas for cultivation of microalgae *Chlorella* sp. in an outdoor open thin-layer photobioreactor. **Journal Applied Phycology** , 2005 .

DRAGONE G, FERNANDES B, VICENTE AA, TEIXEIRA JA. Third generation biofuels from microalgae. In: Méndez-Vilas A, editor. **Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology**

. Badajoz: Formatex, p. 1355–66, 2010.

DRAGONE, G; FERNANDES B.D., ABREU A.P., VICENTE A.A., TEIXEIRA J.A. Nutrient limitation as strategy for increasing starch accumulation in microalgae. **Applied Energy**, 2011.

DROOP, M.R.; The kinetics of uptake growth and inhibition in *Monochrysis lutheri*. **Journal of marine biology**. Association United Kingdom , 48:686–733,1968.

HOSKISSON, P.A.; HOBBS, G. Continuous culture—making a comeback? **Microbiology**, 2005.

HU Q. Environmental effects on cell composition. In: Richmond A, editor. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science.

KUMAR, D.; RAI, J.; GAUR, J.P.; Removal of metal ions by *Phormidium bigranulatum* (cyanobacteria)-dominated mat in batch and continuous flow systems. **Bioresources Technology**, 2012.

LEE, Y-K, CHEN, W.; SHEN, H.; HAN D, LI Y, JONES HDT, *ET AL* Basic culturing and analytical measurement techniques Yuan-Kun. In: Richmond A, Hu Q, editors. **Handbookmicroalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Wiley Blackwell, p. 37–68, 2013.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas** – princípios e aplicações. São Carlos: RiMa, 2006.

MARIANO, A. B. TORRENS, J. C. L.; SATYANARAYANA, K. G.; VARGAS, J. V. C. Energia autossustentável a partir de biodiesel derivado de microalgas. In: **Congresso Internacional de Bioenergia**, 4. , Curitiba, 2010.

MARIANO, A. B; VARGAS, J. V. C.; MELO, T. C., Uso de sensores de infravermelho no controle do cultivo de microalgas em fotobiorreatores compactos para produção de biomassa e biodiesel. **3º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel – RBTB**. 2009.

MATA, T.M; MARTINS, A.A.; CAETANO, N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 217-232, 2010.

MELLO, T. C. ; VARGAS, J. V. C. ; MARIANO, A. B. . Density control of microalgal cultures using infrared sensors. In: 20th **International Congress of Mechanical Engineering**, 2009, Gramado - RS. Proceedings of COBEM 2009. Rio de Janeiro: ABCM, 2009.

MORAES, C.; CASTRUCCI, P.L. **Engenharia de automação industrial**, 2.ed. Rio de Janeiro, 2007.

MULLER-FEUGA, A.; GUÉDES, R.L.; HERVÉ, A.; DURAND, P. Comparison of artificial light photobioreactors and other production systems using *Porphyridium cruentum*. **Jornal of Applied Phycology**, 10:83–90, 1998.

NOÛE, J.; de PAUW, N. The potential of microalgal biotechnology. A review of production and uses of microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 6, p. 725–770, 1988.

OMER, A.M. Energy, environment and sustainable development. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 2008.

PEREIRA , M.G.; CAMACHO,C.F.;FREITAS, M.A.V.;SILVA, N.F.; The renewable energy Market in Brazil. **Renewable and sustainable energy reviews** , 2012.

PULZ, O. Cultivation techniques for microalgae in open and closed ponds. Proceedings of the 1st European workshop on microalgal biotechnology. Potsdam, 1992.

PULZ, O. Photobioreactors: production systems for phototropic microorganisms. **Applied Microbiology e Biotechnology**, v. 57, p. 287-293, 2001.

RAWAT, I., RANJITH, R. Kumar; MUTANDA, T.; BUX, F.. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. **Applied Energy** , 2013.

RICHMOND, A. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Oxford: Blackwell Science Ltda, 2004.

REMMERS, I.M.; HIDALGO-ULLOA, A. ; BRANDT, B.P. ; EVERS , W.A.C. ; WIJFFELS, R.H. ; LAMERS, P.P. . Continuous versus batch production of lipids in the microalgae *Acutodesmus obliquus*, **Bioresource Technology**, 2017.

RICHMOND, A. Large scale microalgal culture and applications. In: ROUND, F.E.; CHAPMAN, D.J. **Progress in physiological research**, v.7, Biopress, Bristol, p. 269-330, 1990.

SANDNES, J.M.; RINGSTAD, T.; WENNER, D.; HEYERDAHL, P.H.; KÄLLQVIST, T.; GISLERØD, H.R. Real-time monitoring and automatic density control of large-scale microalgal cultures using near infrared (NIR) optical density sensors. **Journal of Biotechnology**, 2006.

SINGH, R.N.; SHARMA, S. Development of suitable photobioreactor for algae production – a review. **Renewable and Sustainable Energy**, 2012.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSEN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Comercial applications of microalgae: Review. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006.

TANG, H.; CHEN, M.; SIMON, N.G.; K.Y. SALLEY SO. Continuous microalgae cultivation in a photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, 2012.

TOROGHI, M.K.; GOFFAUX, G.; PERRIER, M. Output *feedback* passivity-based controller for microalgae cultivation. 12th IFAC Symposium Comput Applied Biotechnology. Mumbai, India: The International Federation of Automatic Control; 2013.

SASSANO , C.E.N.; GIOIELLI, L.A.; ALMEIDA K.A.; SATO, S, PEREGO. P.; CONVERTI, A.; *et al* Cultivation of *Spirulina platensis* by continuous process using ammonium chloride as nitrogen source. **Biomass and Bioenergy** , 2007.

SOBCZUK, T.M.; CHISTI, Y. Potential fuel oils from the microalga *Choricystis minor*. **Journal Chemical Technology Biotechnology**, 2010.

MAEDA, I.; SETO ,Y.; UEDA ,S.; CHENG, Y.; HARI ,J.; KAWASE ,M. *et al*. Simultaneous control of turbidity and dilution rate through adjustment of medium composition in semi-continuous *Chlamydomonas* cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, 2006.

UTKILEN, H.; GJØLME, N.; Toxin production by *Microcystis aeruginosa* as a function of light in continuous cultures and its ecological significance. **Applied Environment Microbiology** , 1992.

SANTOS, B. Estratégias para aumentar a produtividade de biomassa de microalgas com carbono orgânico. **Tese de mestrado**. Programa de pós-graduação em engenharia e ciência dos materiais - UFPR, 2016.

VARGAS, J.V.C.; MARIANO, A.B.; CORRÊA, D.O.; ORDONEZ, J.C. The microalgae derived hydrogen process in compact photobioreactors, **International Journal of Hydrogen Energy** , 2014.

GLOSSÁRIO

in-situ – termo em latim para “no lugar” , refere-se á medições realizadas diretamente no reator.

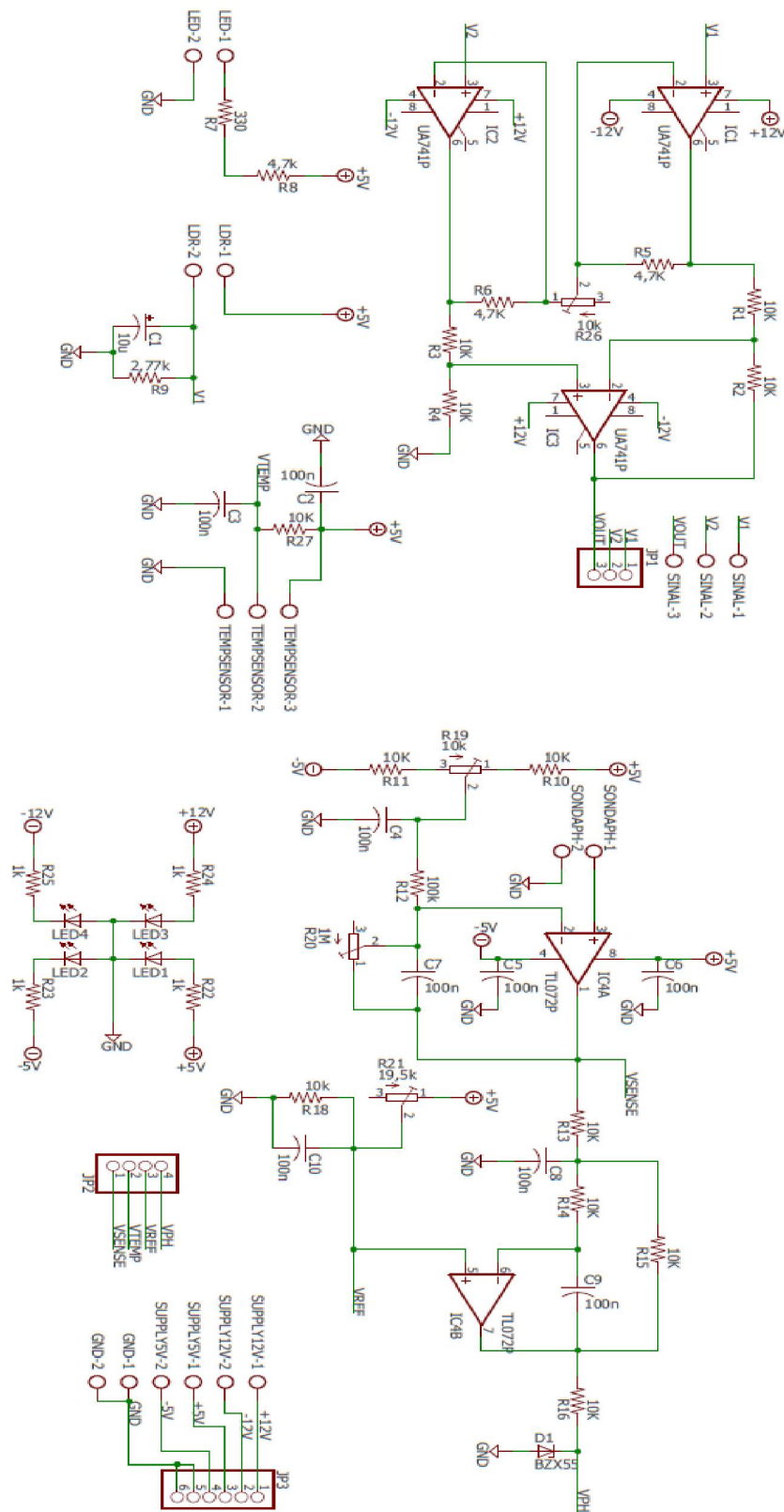
online – ligado, conectado, em linha. Refere – se à informações obtidas automaticamente e disponibilizadas por meios digitais.

offline – desligado, desconectado. Refere-se a análises quantitativas de laboratório feitas manualmente.

feedback – Tipo de controle onde a ação é calculada pela comparação entre a medida da variável do processo e o valor de referência.

feedforward – Tipo de controle onde é usado a medição de uma variável indireta para o controle de outra. São usados modelos matemáticos e estimadores para determinar a variável de processo

ANEXO A – CIRCUITO PARA MEDIÇÃO DE PH



FONTE: <https://github.com/hephesto/phduino>